Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zum Stoffwechsel des HARDING-PASSEY-Melanoms in Zellkultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Rolf-Dieter Fischer
aus Gießen

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Philipps-Universität Marburg

Untersuchungen zum Stoffwechsel des HARDING-PASSEY-Melanoms in Zellkultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philippsuniversität Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Rolf-Dieter Fischer
aus Gießen

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 24. 11. 1969

gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Referent: Prof. Dr. rer. nat. F. Zilliken

Correferent: Prof. Dr. med. J. Rohen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Einleitung und Arbeitsziel	1
1.1	Vorgeschichte des HARDING-PASSEY-Melanoms	4
1.2	Eigenschaften des Tumors	5
1.3	Die entwicklungsgeschichtliche Herkunft der Pigmentzellen: Neuralleistentheorie	6
1.4	Die Entwicklungspotenzen des Neuralleistenmaterials	7
1.5	Die Physiologie und Pathologie des Tyrosinstoffwechsels	9
2	Methodik	14
2.1	Material	14
2.2	Isolierung und Kultivierung des HARDING-PASSEY-Melanoms	16
2.3	Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur	17
2.4	Kontrolle der Tumorogenität von HARDING-PASSEY-Melanomzellen nach Wachstum in Zellkultur	19
2.5	Bestimmung von Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Zellkultur	19
2.6	Darstellung von Melanin aus Dihydroxyphenylalanin (Dopa)	20
2.7	Extraktion von Melanin aus Tumorgewebe des HARDING-PASSEY-Melanoms	20
2.8	Bestimmung des Melaningehaltes in Zellkultur	22
2.9	Experimente mit radioaktiv markiertem Tyrosin, Leucin und Thymidin	24

Seite

3 Ergebnisse 28

3.1 Zellvermehrung 28

3.2 Tumorogenität von HARDING-PASSEY-Melanom-zellen nach Wachstum in Zellkultur 29

3.3 Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie 31

3.4 Tyrosinstoffwechsel und Melaninsynthese von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur 34

3.41 Wirkung von Actidion 34

3.42 Wirkung von Phenylthioharnstoff 35

3.43 Wirkung von Dopa 36

3.44 Wirkung von Cu^{++}-Ionen 37

3.45 Wirkung von Dopa + Cu^{++}-Ionen 37

3.46 Wirkung von Tyrosin 37

3.47 DNS-Synthese und Melaningehalt 38

4 Diskussion 40

5 Zusammenfassung 46

Anerkennung

Literatur

Lebenslauf

Akademische Lehrer

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BME	Basal Medium Eagle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dopa	3,4-Dihydroxyphenylalanin
E_{400}	Extinktion bei 400 nm (10^{-9} m)
HPM	HARDING-PASSEY-Melanom
mC, µC	Millicurie, Mikrocurie
n	normal
PTH	Phenylthioharnstoff

1 Einleitung und Arbeitsziel

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen an isolierten und in Zellkultur wachsenden Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms berichtet.

Solche Untersuchungen sind möglich geworden, seitdem durch die Fortschritte der Zell- und Gewebekultur Säugetierzellen außerhalb des Organismus in synthetischen Nährmedien am Leben erhalten werden können.

Zweifellos sind die Wachstumsbedingungen von Zellen nach der Isolierung aus Geweben und Organen und nachfolgender Kultivierung mit den Bedingungen in vivo nicht identisch. Insbesondere fehlt die "physiologische" Umgebung, der innervierte und vaskularisierte Gewebsverband. Damit entfällt ein Teil der zellulären und humoralen sowie alle nervösen Kontrollmechanismen, die unter physiologischen Verhältnissen das Wachstum und die spezifischen Funktionen von Zellen entscheidend beeinflussen.

Einige Autoren haben deshalb behauptet, daß Zellen in Zellkultur ihre ursprüngliche Differenziertheit zwangsläufig verlieren. Es soll nicht bestritten werden, daß Entdifferenzierungsvorgänge in Zellkultur vorkommen, jedoch muß die Zwangsläufigkeit solcher Erscheinungen in Frage gestellt werden und ist zur Zeit noch Gegenstand der wissenschaftlichen Auseinandersetzung. So gelang in den letzten Jahren u.a. die Isolierung von Herzmuskelzellen, die sich im künstlichen Medium weiterhin rhythmisch kontrahieren [11,31], von Bindegewebszellen, die Kollagen und Mukopolysaccharide bilden [9,24,28,32], von Drüsenzellen, die spezifisch wirksame Hormone sezernieren [10,66].

Neben diesen Beispielen und einer Vielzahl weiterer Beobachtungen sprechen auch eigene am HARDING-PASSEY-Melanom erhobene Befunde (über 2 Jahre konstante Melaninsynthese in Zellkultur) dafür, daß Zellen in Kultur nicht nur überleben, sondern außerdem noch Stoffwechselaufgaben erfüllen können, die nur für den Gesamtorganismus sinnvoll, für das Weiterleben der betreffenden Zellen dagegen nicht unbedingt erforderlich sind (spezifische Zellfunktionen, ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Differenzierungsgrades von Zellen).

Es besteht daher Grund zu der Annahme, daß Leben, Vermehrung und spezifische Funktionen von Zellen in Zellkultur in geeigneten Fällen nicht wesentlich von den betreffenden Vorgängen in vivo verschieden sind. Unter dieser Voraussetzung ist die Zellkultur eine geeignete und durch ihre technischen Besonderheiten in vieler Hinsicht überlegene Methode zum Studium von Lebensvorgängen: zum einen ist das Kulturmedium (das "Milieu" der Zellen) chemisch definiert und kann in seiner Zusammensetzung willkürlich verändert werden; zum anderen sind die aus den Zellleistungen resultierenden Veränderungen im Medium und an den Zellen selbst mit biochemischer und zytologischer Methodik relativ leicht erfaßbar.

Um hierbei spezifische und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, daß alle Zellen in einer Kultur einander gleich und "definiert" sind, d.h., daß ihre Eigenschaften durch exakt bestimmbare Parameter kontrolliert werden können. Im Falle der HARDING-PASSEY-Melanomzellen ist neben der Vermehrungsgeschwindigkeit, der Chromosomenzahl und -morphologie sowie dem Verhalten der Zellen nach subkutaner Injektion in Mäuse vor allem die oben bereits

erwähnte Fähigkeit zur Melaninsynthese als ein solcher Parameter zu bewerten.

Während so die Konstanz der Zelleigenschaften mehrfach kontrolliert wurde, konnte das eigentliche Ziel dieser Arbeit verfolgt werden: der Versuch, durch Beobachtung insbesondere des Tyrosin-Stoffwechsels und seines Zusammenhangs mit der Melaninsynthese sowie seiner Beeinflußbarkeit durch verschiedene Substanzen etwas zur Kenntnis über die Physiologie der Melaninsynthese beizutragen.

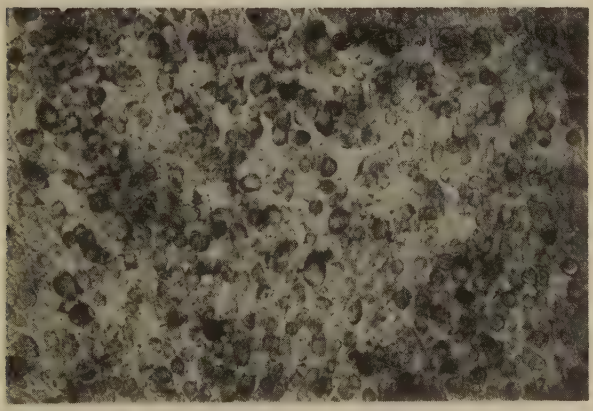

Abb. 1 Pigmenthaltige HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Zellkultur. Relativ hoher Anteil pigmenthaltiger Zellen sowie hoher Pigmentgehalt einzelner Zellen bei großer Dichte des Zellrasens. Man beachte die Anordnung des Melanins im Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns. Mikrophotogramm der an der Innenwand der Kulturflasche haftenden, lebenden, ungefärbten Zellen mit dem umgekehrten Mikroskop ("Plankton") von Zeiss. Vergr. 150-fach.

1.1 Vorgeschichte des HARDING-PASSEY-Melanoms [4]

Das HARDING-PASSEY-Melanom ist ein spontan entstandener Tumor, der im August 1925 am linken Ohr einer braunen Maus im Laboratorium von R.A. PASSEY an der Leeds University Medical School in Leeds, England, entdeckt wurde [33].

Der knapp weizenkorngroße Tumor war gelappt und dunkel pigmentiert. Histologisch war keine Infiltration in den Ohrknorpel und in die Epidermis nachzuweisen.

HARDING und PASSEY [33] benutzten aus verschiedenen Stämmen gekreuzte braune Mäuse für ihre Transplantationsversuche. Die Impftumoren wuchsen langsam und erreichten sechs Monate nach der Inokulation gewöhnlich einen Durchmesser von mehreren Zentimetern. Durch selektive Transplantation von geringer pigmentierten Tumoranteilen gelang es HARDING und PASSEY, einen weitgehend amelanotischen Tumor herauszuzüchten. Der Melaningehalt der verschiedenen Tumorformen erwies sich dabei als unabhängig von der Haarfarbe der Wirtstiere.

In zahlreichen Untersuchungen wurde der Tumor auf Albinomäuse verschiedener Stämme sowie auf C_{57}BL-, DBA-, C_3H- und Agouti (New York)-Mäuse übertragen [4]. SUGIURA fand bei 1500 größtenteils mit der Trokartechnik geimpften Mäusen ein erfolgreiches Anwachsen des Tumor-Transplantates in 95 % der Fälle [72]. Das Melanom erreichte nach ca. 16 Wochen einen mittleren Durchmesser von 5 cm und war dann meist ulzeriert. Die Mäuse starben in der Regel 5 Monate nach der Inokulation an Sepsis oder Ernährungsstörungen.

1.2 Eigenschaften des Tumors [4]

Ebenso wie das ursprüngliche wächst auch das derzeitige HARDING-PASSEY-Melanom als ein scharf abgrenzbarer, solider Tumor, der von einer bindegewebigen Kapsel umgeben ist. Es gibt sowohl einheitlich schwarze als auch von helleren Bezirken durchsetzte Formen des Melanoms. In der Umgebung des Tumors ist nur eine minimale Gefäßreaktion zu beobachten (Fensterungstechnik nach ALGIRE [2]).

Histologisch finden sich im wesentlichen zwei Zellarten: erstens die neoplastischen Zellen, welche die Hauptmasse des Tumors ausmachen und zum größeren Teil als Melanoblasten[x)], zum kleineren Teil dagegen als Melanozyten[xx)] vorkommen, die das Pigment in Form von feinen Granula in perinukleärer, peripherer oder diffuser Anordnung enthalten, zweitens Makrophagen, die überall im Tumor vorkommen, sich jedoch im Zentrum und in der Umgebung von Nekroseherden häufen. Letztere enthalten das sekundär aufgenommene (phagozytierte [30]) Melanin in dichten, unregelmäßig geformten Klumpen, die häufig den Zellkern verdecken. Die Tumorzellen und Phagozyten sind in relativ wenig Bindegewebsstroma eingebettet. Gelegentlich erscheinen die regionären Lymphknoten dunkel pigmentiert. Histologische Kontrollen zeigten, daß es sich hierbei nicht um Lymphknotenmetastasen, sondern um Ansammlungen von melaninhaltigen Makrophagen handelt.

x) Melanoblasten sind die Vorstufen der Melanozyten und enthalten kein Pigment, sondern farblose, elektronenmikroskopisch erkennbare Granula (Melanosomen).

xx) Melanozyten sind "reife" Pigmentzellen, die lichtmikroskopisch sichtbares, eigenproduziertes Pigment enthalten.

1.3 Die entwicklungsgeschichtliche Herkunft der Pigmentzellen: Neuralleistentheorie

Melanozyten gehen aus farblosen Mutterzellen hervor, die sich kaum von Bindegewebszellen unterscheiden lassen. Dies ist der Hauptgrund dafür, daß die Frage nach der Herkunft der Pigmentzellen lange Zeit nicht entschieden werden konnte.

An älteren, heute überholten Theorien seien genannt [16,70]:

a) Pigmentzellen sind modifizierte Bindegewebszellen (ELIAS, KÖLLIKER [46], LEYDIG, RABL, SCHMIDT).
b) Pigmentzellen sind modifizierte Leukozyten (AEBY, RABL).
c) Pigmentzellen sind modifizierte Epidermiszellen, die teilweise sekundär in das Korium abwandern (JARISCH [43], KREIBICH [47]).

Die Abstammung der Pigmentzellen von der Neuralleiste wurde zunächst nur vermutet (BORCEA 1909, WEIDENREICH 1912 [76]), gestützt von der Beobachtung, daß bei der Explantation von embryonalen Medullarplatten in Rückenmarksmaterial von Amphibien in vitro Pigmentzellen auftreten (HARRISON 1910 [35], HOLTFRETER 1929 [41], MANGOLD 1929 [54]).

Neben TWITTY [73] und RAVEN [63,64] hat vor allem DU SHANE, ein Mitarbeiter von HARRISON, diese Beobachtungen zum Anlaß exakter Versuche gemacht (1934). Mittels Exstirpation und Transplantation von Neuralleistenmaterial bewies er, daß bei Amphibien der Ursprungsort der peripheren Pigmentzellen ausschließlich die Neuralleiste ist [15-18]. Dieselbe Gesetzmäßigkeit demonstrierte DORRIS 1936 am Vogelkeim: Explantate von Neuralleistenmaterial aus Hühnerembryonen ergaben Pigmentzellbildung in vitro [12,13];

Transplantate erzeugten Pigmentierung vom Spendertyp im Versuchsbereich (Bein) [14]. Auch für das Säugetier (Maus) konnte die Gültigkeit der Neuralleistentheorie festgestellt werden(RAWLES 1947 [65]).

1.4 Die Entwicklungspotenzen des Neuralleistenmaterials

Aus dem äußeren Keimblatt oder Ektoderm gehen unter anderem die wichtigen Organanlagen der Epidermis und des Zentralnervensystems hervor.

An der Stelle, wo sich die Neuralrinne zum Neuralrohr schließt und dann von der Epidermis loslöst, findet sich eine Anhäufung von Zellen, welche eine selbständige embryonale Organanlage darstellt: die Neuralleiste. Ebenso wie die Epidermis ist sie ein Derivat des Ektoderms. Zahlreiche und zum Teil recht verschiedenartige Gewebe differenzieren sich aus diesem Embryonalorgan:

a) Bereits 1887 bewies HIS [39,40], daß aus der Neuralleiste die Spinalganglien entstehen. Auch am Aufbau der sensiblen Kopfganglien und des Sympathikus ist Neuralleistenmaterial beteiligt. Aus der Anlage des Sympathikus, also letztlich ebenfalls aus der Neuralleiste, entstehen die spezifischen Zellen der sympathischen Paraganglien und des Nebennierenmarks; diese bilden die kreislaufwirksamen Stoffe Adrenalin und Noradrenalin und sind histochemisch durch die Braunfärbung bei der Anwendung von Oxydationsmitteln (insbesondere von chromsauren Salzen) gekennzeichnet, weshalb sie auch als phaeochrome oder chromaffine Zellen bezeichnet werden.

b) 1894 betonte neben anderen Autoren vor allem J. PLATT [61] die Beteiligung der Neuralleiste an der Mesenchymbildung. Sie hat als erste die Entstehung von Skeletsubstanz (knorpelige Schädelanlage) aus Neuralleistenmaterial beobachtet. Dieser zunächst stark angezweifelten Beobachtung verhalf erst der durch experimentelle Methoden (Exstirpation, Transplantation und Vitalfärbung) erbrachte Beweis (LANDACRE [50], STONE [61] u.a.) zu allgemeiner Anerkennung.

c) 1904 fand HARRISON [34,35], daß nach der Entfernung des dorsalen Rückenmarksanteils zwar zwar motorische Nervenfasern auswachsen; diese sind jedoch nicht, wie normalerweise, von Markscheiden umgeben, sondern nackt. Hiernach erwies sich die Neuralleiste als der wichtigste (wenn auch nicht einzige) Ursprungsort der peripheren Glia.

d) Zur Abstammung der Pigmentzellen von der Neuralleiste s.o.

Zusammenfassend läßt sich die Entwicklungsmöglichkeit der Neuralleistenzellen nach heutiger Ansicht folgendermaßen schematisieren [70]:

Aus der Neuralleiste entstehen

1. pseudounipolare Ganglienzellen (allgemeine Sensibilität)
2. multipolare Ganglienzellen (Sympathikus)
3. chromaffine Zellen des Nebennierenmarks und der Paraganglien
4. SCHWANN' Zellen (periphere Glia)
5. Mesenchym, Leptomeninx
6. Knorpelzellen
7. Knochenzellen
8. Odontoblasten
9. Pigmentzellen

} Mesektoderm

Die biochemischen Leistungen der sich aus der Neuralleiste entwickelnden Zellen unterscheiden sich zum Teil beträchtlich. In Verbindung mit den Untersuchungen zur Pigmentbildung ist es jedoch erwähnenswert, daß die Pigmentzellen und die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nicht nur entwicklungsgeschichtliche, sondern insbesondere im Tyrosinstoffwechsel auch biochemische Gemeinsamkeiten besitzen.

1.5 Die Physiologie und Pathologie des Tyrosinstoffwechsels

Die Aminosäure Tyrosin ist nicht nur ein Bestandteil aller Proteine, sondern auch die Ausgangssubstanz für die Synthese einer Reihe physiologisch wichtiger Verbindungen. Die Stoffwechselwege zu diesen Verbindungen und die wichtigsten heute bekannten Abweichungen in ihnen mit den daraus folgenden klinischen Syndromen sind in dem folgenden Schema dargestellt:

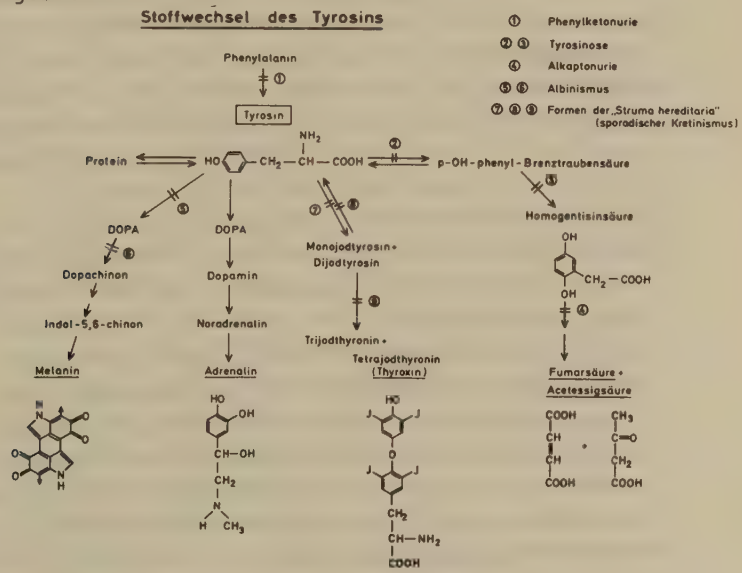

Abb. 2 Stoffwechselschema des Tyrosins.

Tyrosin ist physiologischerweise keine essentielle Aminosäure, da es im normalen Stoffwechsel aus Phenylalanin hergestellt werden kann. Unter pathologischen Bedingungen kann Tyrosin jedoch essentiell sein, nämlich dann, wenn das Enzym Phenylalaninhydroxylase in der Leber durch genetischen Defekt fehlt oder stark vermindert ist [44]. Das zugehörige klinische Bild ist unter dem Namen Phenylketonurie bekannt und ist 1934 von FÖLLING erstmals beschrieben worden [26]. Leitsymptom ist die mehr oder weniger ausgeprägte Oligophrenie; daneben bestehen vielfach Entwicklungsstörungen, ekzemartige Veränderungen der Haut sowie eine relative Pigmentarmut [25]. Die pathologischen Metaboliten üben eine vielfältige Hemmwirkung auf den Tyrosinstoffwechsel aus (Melanozyten und phaeochrome Zellen des Nebennierenmarks sind in ihren spezifischen Zellfunktionen gleichermaßen gehemmt) [25,58].

Der Abbau des Tyrosins geht über die p-Oxyphenylbrenztraubensäure und die Homogentisinsäure schließlich zur Fumarsäure und Azetessigsäure [59]. Eine bereits seit 1908 durch GARROD [27] bekannte angeborene Störung dieses Abbaus führt zur Alkaptonurie [48], wobei vermehrt Homogentisinsäure im Harn ausgeschieden wird, welche den Harn durch ihre Oxydationsprodukte nach längerem Stehen an der Luft dunkel werden läßt. Dieses Phänomen ist bereits im Mittelalter beobachtet worden. Gewöhnlich ist diese Stoffwechselanomalie nicht mit besonderen Beschwerden verbunden, jedoch kann es nach jahrzehntelangem Bestehen zu degenerativen Veränderungen an den Gelenken (Arthrosen) und eigentümlichen Verfärbungen besonders des Knorpels kommen, die in der Mitte des vorigen Jahrhunderts von VIRCHOW unter der Bezeichnung Ochronose beschrieben worden sind [75].

Eine seltene Störung des Tyrosin-Abbaus ist die 1932 von MEDES beschriebene Tyrosinose [56], so von ihr genannt, weil bei ihrem Patienten nach Tyrosinbelastung unter anderem auch die Aminosäure selbst in unveränderter Form vermehrt ausgeschieden wurde. Die Umwandlung der p-Oxyphenylbrenztraubensäure zu Homogentisinsäure ist hierbei beeinträchtigt [22,23,48].

Tyrosin wird zum Aufbau folgender Verbindungen gebraucht:

1. Proteine

2. Schilddrüsenhormone: in der Schilddrüse wird Tyrosin zu Monojodtyrosin(MJT) und Dijodtyrosin (DJT) jodiert; je zwei jodierte Tyrosinmoleküle werden zu Trijodthyronin (T_3) und Terajodthyronin (T_4) = Thyroxin gekoppelt. T_3 und T_4 sind die wirksamen Hormone.

Die Hormonsynthese kann an verschiedenen Stellen gestört sein [69]. Klinisch entsteht bei allen Enzymstörungen, die mit einer verminderten Hormonproduktion einhergehen, ein mehr oder weniger ausgeprägtes Bild des sporadischen Kretinismus mit Kropf, weil die durch den niedrigen Hormonspiegel enthemmte Hypophyse das funktionsuntüchtige Schilddrüsengewebe zur Hyperplasie anregt.

Interessant ist, daß auch ein Fehlen der Dejodinase (Nr. (8) in Abb. 2) zum Hormonmangel mit kompensatorischer Kropfbildung führen kann. Dies versucht man damit zu erklären, daß die unwirksamen Hormonvorstufen MJT und DJT in den Blutkreislauf gelangen (was sonst durch die Dejodinase verhindert wird) und zum Teil durch die Nieren ausgeschieden werden; dieser Verlust an jodhaltigen Verbindungen führt beim gleichzeitigen Vorliegen von äußeren Realisationsfaktoren (geringe Verminderung der Jodzufuhr) zum relativen Hormonmangel mit daraus resultieren-

der Kropfbildung [69].

3. Adrenalin und Noradrenalin: diese Stoffe werden im Nebennierenmark, in den sympathischen Paraganglien und an den sympathischen Nervenendigungen freigesetzt. Im ersten Syntheseschritt wird genau wie in den Melanozyten Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin oxydiert. Spezielle Störungen des Weges sind nicht bekannt, zumindest ist die Adrenalinbildung beim Albinismus nicht vermindert [25]; jedoch ist sie bei der Phenylketonurie ebenso wie die Melaninsynthese durch die toxischen Metaboliten unspezifisch gehemmt [25,58].

4. Melanin: die Bildung des Melanins aus Tyrosin geschieht in den Melanosomen der Pigmentzellen durch die Einwirkung des Enzyms Tyrosinase.

Während die Oxydation des L-Tyrosins zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin nur in Anwesenheit des Enzyms geschieht, wird die weitere Oxydation zu Dopachinon und den folgenden Zwischenstufen durch das Ferment lediglich beschleunigt, läuft aber auch spontan ab (Autoxydation). Nach MASON wird das als letztes Zwischenprodukt aus dem 5,6-Dihydroxyindol entstehende Indol-5,6-chinon spontan zum Melanin polymerisiert.

So ist es möglich, ohne jede Enzymeinwirkung, vom Dopa ausgehend, ein synthetisches Melanin zu erhalten, welches dem natürlich vorkommenden Melanin im Absorptionsspektrum sehr ähnlich ist (s.u., Darstellung von Melanin aus Dopa).

Das Fehlen der Tyrosinase durch genetischen Defekt ist eine Stoffwechselanomalie, die als Albinismus bekannt ist. Hierbei sind die Melanozyten zwar vorhanden, sie bilden jedoch wegen des Mangels an Tyrosinase kein Melanin. Die Störung kann generalisiert auftreten oder auf bestimmte Gebiete des Körpers beschränkt sein, wie zum Beispiel auf die Augen, die Haare oder das Integument. Die klinischen

Symptome sind Blässe der Haut, weiße Haare, gering pigmentierte Iris und eine charakteristische Photophobie. Die Epidermis ist außerordentlich strahlensensibel und neigt in hohem Maße zu strahlungsbedingten Dermatosen, Präkanzerosen und malignen Tumoren.

Das Vorkommen von Photophobie und Strahlendermatosen bei Pigmentmangel weist auf die große physiologische Bedeutung des Melanins als Strahlenschutzfaktor hin.

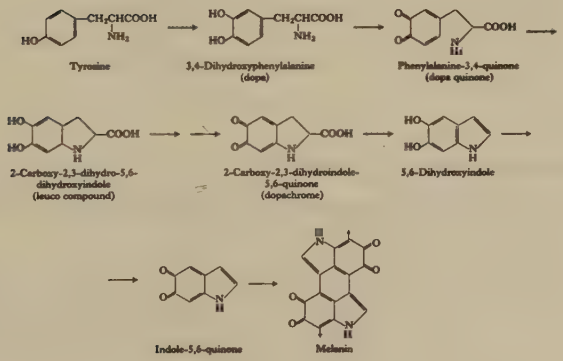

Abb. 3 Synthese des Melanins aus Tyrosin (nach MEISTER [57]).

2 Methodik

2.1 Material

1. Kulturmedium (Grand Island Biological Company)
   a) Basal Medium Eagle (BME) als Trockenpulver (Zusammensetzung siehe Abb. 4)
   b) Zusatz von 10% fetalem Rinderserum
   c) Zusatz von Antibiotika: pro ml Medium 100 E. Penicillin und 100 µg Streptomycin
2. Kulturflaschen (Federated Distributors)
   Pharmazieflaschen zu 2 und 4 ounce (50 bzw. 100 ml)
3. Earle's Salz-Lösung (die auch dem Medium zugrundeliegt, selbst bereitet in folgender Zusammensetzung:

NaCl	6,800 g/l
KCl	0,400 g/l
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,125 g/l
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,200 g/l
$CaCl_2$	0,200 g/l
$NaHCO_3$	2,200 g/l

4. Reagentien
   a) radioaktive Substanzen:
   L-Tyrosin-U-^{14}C, spezifische Aktivität 5,5 mC/mMol der Fa. Amersham
   L-Leucin-1-^{14}C, spezifische Aktivität 34,1 mC/mMol der Fa. New England Nuclear Corp.
   Thymidin-2-^{14}C, spezifische Aktivität 30 mC/mMol der Fa. New England Nuclear Corp. (hierbei Zusatz von 12 µg kaltem Thymidin pro Ansatz)
   Bei allen Experimenten wurde pro Ansatz (5 ml Medium) 0,05 µC Radioaktivität zugesetzt.
   b) Phenylthioharnstoff (Abb. 5) der Fa. Schuchardt als Inhibitor der Tyrosinase. Nach Lösung von 11,4 mg in 1 ml Äthanol konnte 9 ml Basal Medium Eagle zugegeben werden; von dieser Lösung ($7{,}5 \times 10^{-3}$-molar) wurde 0,1 ml pro Ansatz (5 ml Medium) verwendet. Bei diesem Verfahren werden die Kulturen einer Alkoholkonzentration von 2 Promille ausgesetzt. Um eine eventuelle Beeinflussung der Zellen durch den Alkohol

nicht unberücksichtigt zu lassen, wurden die Kontrollen in den Versuchen mit Phenylthioharnstoff ebenfalls mit den entsprechenden Alkoholkonzentrationen inkubiert.

c) Actidion der Fa. Upjohn, Menge pro Ansatz 0,2 - 125 µg

d) DL-ß-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) der Fa. Schuchardt

BASAL MEDIUM (EAGLE) mit "Earle's Salzen"

Bestandteil	mg/L	Bestandteil	mg/L
NaCl	6800,0	L-Methionin	7,50
KCl	400,0	L-Phenylalanin	16,50
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	140,0	L-Threonin	24,0
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	200,0	L-Tryptophan	4,0
$CaCl_2$ (anhyd.)	200,0	L-Valin	23,50
$NaHCO_3$	2200,0	Biotin	1,0
Glukose	1000,0	Folsäure	1,0
L-Glutamin	292,0	Cholin	1,0
L-Arginin HCl	21,0	Nicotinsäureamid	1,0
L-Cystin	12,0	D-Ca-Pantothensäure	1,0
L-Tyrosin	18,0	Pyridoxal HCl	1,0
L-Histidin	8,0	Thiamin HCl	1,0
L-Isoleucin	26,0	Riboflavin	0,10
L-Leucin	26,0	meso-Inosit	1,80
L-Lysin	26,0	Phenolrot	10,0

Ref.: Earle, W.R., J. Natl. Cancer Inst. 4, 167 (1943)
Eagle, H., Science 122, 501 (1955)

Modifiziert: $MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$ anstelle von $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$

Abb. 4
Basal Medium Eagle

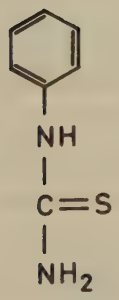

Abb. 5
Phenylthioharnstoff

2.2 Isolierung und Kultivierung des HARDING-PASSEY-Melanoms

Die Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms wurden von SCHACHTSCHABEL [68] im April 1967 isoliert und unter sterilen Kautelen in die Zellkultur überführt und seitdem in Kultur gehalten.

Die Zellen werden in sterilisierten Kulturflaschen mit 5 ml (2-ounce-Flaschen) bzw. 10 ml (4-ounce-Flaschen) Kulturmedium (s. Abb. 4) im Brutschrank bei 37°C gezüchtet. Die Flaschen liegen waagerecht. Die Zellen, bei der Einsaat noch in Suspension, sinken der Schwere nach im Medium ab und heften sich an die Glaswand der Kulturflasche. Dort bilden sie einen mehr oder weniger dichten, einschichtigen Zellrasen (sog. "monolayer culture").

Der Mediumwechsel geschieht alle 48 Stunden, bei großer Zellzahl mit entsprechendem Mediumverbrauch (angezeigt durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot nach Gelb bei pH-Abfall) alle 24 Stunden. Das verbrauchte Medium wird dekantiert und 5 bzw. 10 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium mit einer sterilen Pipette eingefüllt. Anschließend werden die Kulturen mit einem Gasgemisch von 7 % CO_2, 20 % O_2 und 73 % N_2 begast.

Die Subkultivierung geschieht etwa alle 4 Wochen durch mechanische Ablösung der Zellen einer dicht bewachsenen Kulturflasche und Aufteilung der so gewonnenen Suspension auf drei bis vier neue Flaschen.

Weitere Einzelheiten zur Zellkultivierung siehe bei SCHACHTSCHABEL [67,68].

2.3 Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur

Bei der Vermehrung von Einzelzellen sind im wesentlichen zwei Vorgänge zu unterscheiden: zum einen die Vermehrung der Zellmasse (Protein, DNS etc.) der einzelnen Zellen ohne Veränderung der Zellzahl, zum anderen die Zellteilung, wodurch die Masse pro Einzelzelle wieder reduziert, die Zellzahl jedoch verdoppelt wird. Normalerweise tritt die Zellteilung immer beim Erreichen einer ganz bestimmten Zellgröße ein, so daß eine bestimmte Anzahl von Zellteilungen auch mit einer bestimmten Zunahme von Zellmasse verbunden ist. Da sich diese zellulären Vorgänge in einer exponentiell wachsenden Kultur zeitlich unabhängig voneinander (asynchron) abspielen, kann die mittlere Masse einer gegebenen Zellzahl als konstant angesehen werden:

$$\frac{\text{Zellmasse}}{\text{Zellzahl}} = \text{konstant}$$

Für die Zellmasse kann auch das Zellprotein eingesetzt werden, weil der Proteingehalt, wenn man vom Wasser absieht, im allgemeinen den größten Teil der Zellmasse ausmacht und zu ihr in einem konstanten Verhältnis steht. Es gilt also für eine exponentiell und asynchron sich vermehrende Zellkultur die direkte Proportionalität von Zellzahl und Gesamtprotein der Kultur.

Damit bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit in Zellkulturen, nämlich durch Zellzählung und durch Proteinbestimmung (oder Bestimmung eines anderen konstanten Zellparameters - z.B. DNS-Gehalt).

a) Zellzählung: die Zellen haften an einer Glasfläche und lassen sich daher mikroskopisch gut beobachten. (umgekehrtes Mikroskop von Zeiss "Plancton"; siehe

auch Abb. 1). Als zweckmäßig erwies sich die 100-fache Vergrößerung (je 10-fache Objektiv- und Okularvergrößerung). Das Mikroskop wurde im Wärmeraum (37°C) aufgestellt und die Kulturflasche so auf dem Kreuztisch des Mikroskopes fixiert, daß zur fortlaufenden Zellzählung immer dasselbe Gesichtsfeld eingestellt blieb. Diese Lösung war jedoch wegen der für eine statistische Aussage zu geringen Zellzahl unbefriedigend; deshalb wurden später 5 Gesichtsfelder ausgewertet, die zu jeder Zählung jeweils mit Hilfe der Koordinaten des Kreuztisches erneut eingestellt wurden.

b) Proteinbestimmung: aus einem Kollektiv von gleichzeitig, mit gleicher Zellzahl und unter gleichen Bedingungen angesetzten Kulturen wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten je zwei Kulturen zur Gesamtproteinbestimmung entnommen.

Hierzu wurde das Medium dekantiert, die Zellen zweimal mit je 10 ml Earle's Salz-Lösung gewaschen (die Zellen bleiben hierbei an der Wand der Kulturflasche haften) und die Flaschen zum Auslaufen 10 Minuten umgekehrt aufgestellt. Danach wurden die Zellen in n NaOH gelöst und 0,2 ml dieser Lösung zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al. [53] in der Modifikation nach OYAMA und EAGLE [60] verwendet. Bei jeder Bestimmung wurden zur Standardisierung verschiedene Albuminkonzentrationen (10, 25, 50, 100, 150 µg/Ansatz) mitgemessen. Als Referenzsubstanz diente Rinderalbumin (Sigma Chem. Co.).

2.4 Kontrolle der Tumorogenität von HARDING-PASSEY-Melanomzellen nach Wachstum in Zellkultur

Um zu erfahren, ob die ursprünglichen Tumoreigenschaften in der Zellkultur erhalten geblieben sind, wurden Suspensionen von Kulturzellen unter die Rükkenhaut (subkutan) von NMRI-(Albino) Mäusen injiziert.

Die Kulturzellen wurden nach mechanischer Ablösung durch Zentrifugation und Resuspension in geringeren Volumina auf etwa 200.000 Zellen pro ml Medium konzentriert. Von dieser Suspension erhielt jede Maus 0,5 ml = ca. 100.000 Zellen.

Die Mäuse, bei denen sich ein Melanom entwickelte, wurden meist getötet, wenn der Tumor den Wirt stark behinderte oder zu exulzerieren drohte. Bei der Sektion wurde der fast immer gut abgrenzbare Tumor möglichst sauber herauspräpariert, gewogen, zunächst in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend im Tiefkühlschrank bei -30°C gelagert. Auf diese Weise wurden für die Extraktion von Melanin aus Tumorgewebe ca. 200 g Tumormaterial gewonnwn.

2.5 Bestimmung von Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Zellkultur

Exponentiell wachsende Zellkulturen wurden 6 bis 12 Stunden mit Velban (Grand Island Biological Co.) inkubiert. Velban ist ein Mitosegift, das ähnlich wie Kolchizin die Zellteilung in der Metaphase arretiert. Die so inkubierten Zellen wurden mechanisch von der Kulturflasche abgelöst, zentrifugiert, in einem kleinen Volumen (0,5 ml) Medium resuspendiert und durch Behandlung mit hypotonischer Lösung (15 bis 20 Minuten in 0,7 %

Na-Zitrat-Lösung bei 37°C) zum Quellen gebracht. Anschließend wurden die Zellen nach vorsichtiger Zentrifugation und behutsamem Absaugen des überstehenden Na-Zitrates mit einer jeweils frisch herzustellenden Mischung von 3 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig fixiert und zweimal gewaschen. Schließlich wurden Deckglaspräparate angefertigt und 30 Minuten in Orcein gefärbt, sodann entwässert und eingebettet (Methode nach HIRSCHHORN [38]).

Bei der Auswertung wurden die Präparate mäanderartig nach Mitosen durchsucht. Jede offensichtlich vollständige un einwandfrei zählbare Metaphasenplatte wurde ausgewertet.

2.6 Darstellung von Melanin aus Dihydroxyphenylalanin (Dopa)

Nach der Methode von ARNOW [3] (siehe auch BLOCH und SCHAAF [7]) wurden 250 mg Dopa in 50 ml 0,01-n NaOH gelöst und diese Lösung 2 Tage lang mit H_2O-gesättigter Luft durchperlt. Die tiefschwarze Färbung der Lösung zeigte an, daß Dopa zu Melanin oxydiert worden war. Nun wurde das Melanin mit 10 ml 0,5-n HCl gefällt, abzentrifugiert und das Sediment zehnmal mit je 10 ml 0,005-n HCl gewaschen. Anschließend wurde es in dest. Wasser suspendiert und getrocknet. Es wurden 80 mg Melanin gewonnen, Ausbeute ca. 30 %.

2.7 Extraktion von Melanin aus Tumorgewebe des HARDING-PASSEY-Melanoms

Etwa 10 g Tumorgewebe wurde in kleine Stücke zerschnitten (Ø 1-2 mm) und folgendermaßen behandelt:

1. Extraktion säurelöslicher Bestandteile mit je 30 ml 5 %iger Trichloressigsäure, dreimal je 10

Minuten bei Zimmertemperatur und einmal unter Erhitzen auf 80 bis 90°C.

2. Lipidextraktion und Entwässerung mit je 30 ml 96 %igem Äthanol zweimal 5 Minuten und einem Gemisch von 1 Teil Äthanol zu 1 Teil Diäthyläther, ebenfalls zweimal 5 Minuten. Anschließend Trocknung im Exsikkator.

3. 5 Stunden bei 100°C in 100 ml 5-n NaOH.

4. Nach Abkühlen der Lösung Ansäuern mit konz. HCl bis pH 2.

5. Zentrifugieren und zehnmaliges Waschen des Sedimentes mit je 10 ml 0,005-n HCl. Danach Trocknen und Lösen abgewogener Mengen in 0,1-n oder n NaOH.

Sowohl vom Dopa- als auch vom Tumor-Melanin wurden Lösungen (n NaOH) verschiedener Konzentration hergestellt und ihre Absorption im Bereich von 260 bis 600 nm im Zeiss Spektralfluorometer gemessen (Abb. 6 u. 7)

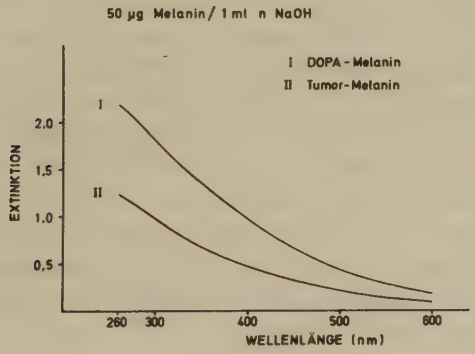

Abb. 6 Extinktionskurven von synthetischem Dopa-Melanin und Tumor-Melanin (HARDING-PASSEY-Melanom).

Die Extinktionskurven beider Melanine zeigen einen sehr ähnlichen, gleichförmigen Verlauf, mit der maximalen Absorption im kurzwelligen Bereich (260 nm)

und einem stetigen Abfall zur langwelligen Seite. Das synthetische Melanin hatte jedoch in allen Bereichen eine etwa doppelt so hohe Extinktion wie das nach unserer Methode aus dem Tumor extrahierte Melanin. Es ist möglich, daß letzteres noch eine Verunreinigung enthält.

2.8 Bestimmung des Melaningehaltes in Zellkulturen

Aus einer Zellkultur stehen nur geringe Substanzmengen für Messungen des Melaningehaltes zur Verfügung (ca. 5 mg Feuchtprotein pro Kultur; nur ein kleiner Teil der Melanomzellen ist pigmentiert). Außerdem befindet sich das Melanin intrazellulär und läßt sich nur unter großen Schwierigkeiten extrahieren. Deshalb wurde eine Methode ausgearbeitet, bei der auch geringe Mengen erfaßbar sind, und zwar durch photometrische Bestimmung des Melaningehaltes ganzer Zellkulturen.

Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte in der bei den radioaktiven Experimenten (s.u.) angegebenen Weise (Säure- und Lipidextraktion), wobei allerdings die Zellproteine und ein Teil der DNS gemeinsam mit dem Pigment in n NaOH gelöst werden. Wegen der Interferenz dieser Zellbestandteile kann für die Bestimmung der Bereich der maximalen Absorption (260 nm) des Melanins nicht genutzt werden. Nach HIRSCH [37] wurde die Extinktion bei 400 nm als Maß für den Melaningehalt gewählt. Die Eignung dieser Wellenlänge ergibt sich aus den folgenden Befunden:

1. Die Proportionalität von Melaninkonzentration und Extinktion wurde sowohl mit Dopa- als auch mit Tumor-Melanin für verschiedene Wellenlängen, insbesondere für 400 nm nachgewiesen (Abb. 7).
2. Die Spezifität der Extinktion bei 400 nm für den Melaningehalt von Lösungen ganzer Zellkulturen in n NaOH ergab sich aus dem Vergleich der Ex-

tinktionskurven von Lösungen pigmentierter und unpigmentierter Zellen (Abb. 8 und 9). Hierbei erwiesen sich die von SCHACHTSCHABEL im Jahre 1963 isolierten und seitdem in Zellkultur gehaltenen EHRLICH-Aszitestumorzellen als geeignete Kontrollen [67,68].

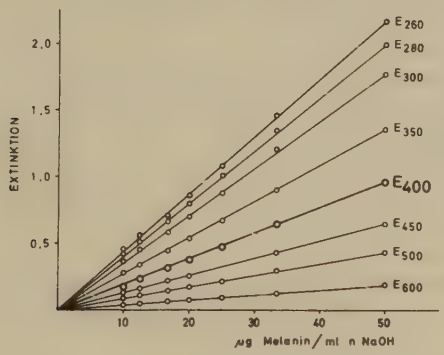

Abb. 7 Proportionalität von Extinktion und Melaninkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen.

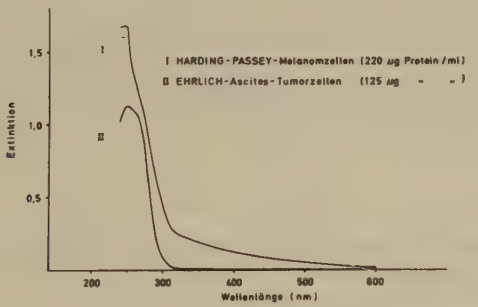

Abb. 8 Extinktion von HARDING-PASSEY-Melanom- und EHRLICH-Aszitestumor-Zellen. Zellkulturen wurden nach Trichloressigsäure-Behandlung und Lipidextraktion in n NaOH gelöst. Der Proteingehalt der Lösung wurde nach LOWRY bestimmt. Extinktionsmessung im Zeiss Spektralfluorometer mit Monochromator.

Aus Abb. 8 geht hervor, daß die Extinktion einer pigmentfreien Zell-Lösung (Aszitestumorzellen) ab 350 nm

praktisch zu vernachlässigen ist, während eine Lösung pigmenthaltiger Zellen noch bei 600 nm deutliche Extinktion zeigt.

Abb. 9 zeigt einen Ausschnitt aus dieser Kurve, gemessen bei einer höheren Zellkonzentration.

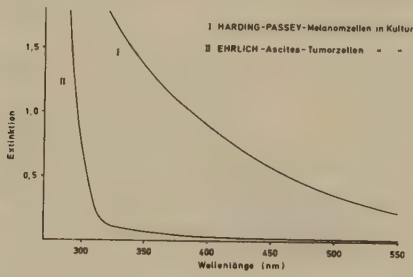

Abb. 9 Zellen und Aufarbeitung wie Abb. 8
Proteingehalt: Melanomzellen 1,53 mg/ml
Aszitestumorzellen 0,87 mg/ml
Legt man für die Berechnung der Melaninkonzentration die Extinktionswerte von Dopa-Melanin bei 400 nm zugrunde (50 µg Melanin pro ml n NaOH entspricht einer Extinktion von 0,963), so hat die Lösung der Melanomzellen eine Melaninkonzentration von 46,5 µg/ml.

2.9 Experimente mit radioaktiv markiertem Tyrosin, Leucin und Thymidin

Bei diesen Versuchen diente der Einbau von ^{14}C-markiertem Tyrosin, Leucin und Thymidin als Maß der Melanin-, Protein- und DNS-Synthese.

Zu jedem Experiment wurden 30 bis 50 Kulturen gleichzeitig, mit gleicher Zellzahl und unter gleichen Bedingungen (2-ounce-Flaschen, 5 ml Medium) angesetzt und zunächst 3 bis 5 Tage im Wärmeraum gehalten. Das

Medium wurde jeweils am 3. und 5. Tag nach der Subkultivierung gewechselt. Einige Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurden dann die radioaktiven Substanzen sowie die bei den einzelnen Experimenten genannten Wirkstoffe in dem Volumen von jeweils 0,1 ml in wäßriger Lösung zugesetzt (mit Ausnahme von Phenylthioharnstoff: Zugabe in 0,1 bis 0,3 ml der o.a. alkoholischen Lösung [s.Seite 14]). Sowohl der Mediumwechsel als auch die Zugabe der Markierungs- und Hemmstoffe geschah im Wärmeraum unter Beibehaltung der Inkubationstemperatur von 37°C, um eine durch Temperaturschwankungen bedingte Wachstumshemmung oder Synchronisierung der Zellen zu vermeiden.

Folgende Versuche wurden mit den Hemmstoffen Actidion und Phenylthioharnstoff (PTH) angestellt:

1. Versuch der selektiven Hemmung der Proteinsynthese mit Actidion in Konzentrationen von 0,04 bis 25,0 µg/ml Medium. Die Kontrolle der Hemmwirkung geschah durch Messung der Einbaurate von Leucin-^{14}C und Tyrosin-^{14}C, wobei besonders darauf geachtet wurde, ob die Hemmung des Tyrosin-Einbaus wegen der evtl. noch bestehenden Melaninsynthese geringer war.

2. Versuch der selektiven Hemmung der Melaninsynthese mit PTH in Konzentrationen von 1,5 bis 4,5 x 10^{-4} Mol/l; Kontrolle durch Vergleich der Einbauhemmung von Tyrosin-^{14}C und Leucin-^{14}C (stärkere Hemmung des Tyrosin-Einbaus weist auf vorwiegende Hemmung der Melaninsynthese hin) sowie durch Vergleich des Melaningehaltes (photometrische Bestimmung, s. Seite 22-24) PTH-inkubierter Kulturen mit normal inkubierten Kontrollen.

3. Versuch der Stimulation des Enzyms Tyrosinase durch Zugabe von Dopa und Cu^{++}-Ionen allein und in Kombination. Von beiden Stoffen ist bekannt, daß sie eine aktivierende Wirkung auf das isolierte Enzym haben [51,52]; Kontrolle durch Vergleich mit dem Tyrosin-Einbau und Melaningehalt normal inkubierter Kulturen.

4. Versuch einer Steigerung der Melaninsynthese durch Anreicherung des Mediums mit Tyrosin (Zugabe von 6×10^{-4} Mol/l); Kontrolle durch Vergleich des Melaningehaltes mit dem normal inkubierter Kulturen.

Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Kulturen in der folgenden Weise aufgearbeitet:

1. Medium dekantieren
2. Zellen einmal kurz waschen mit 10 ml Earle's Salz-Lösung (etwas angewärmt, ca. 30°C)
3. zweimalige Behandlung mit je 10 ml 5 %iger Trichloressigsäure; wenn DNS bestimmt wurde, geschah diese Prozedur in der Kälte (vorgekühlte Trichloressigsäure, Kulturflaschen während der Behandlung auf Eis).
4. Lipidextraktion und Entwässerung mit 10 ml absolutem (vergälltem) Äthanol
5. zweimalige Behandlung mit je 10 ml eines Gemisches von 1 Teil Diäthyläther und 1 Teil Äthanol.

Die Zellen bleiben bei dieser Prozedur am Glas haften und sind nach der Säure- und Alkoholbehandlung endgültig an der Glaswand fixiert. Die Kulturflaschen werden nach der Aufarbeitung ca. 12 Stunden offen gelassen und dabei umgekehrt aufgestellt, so daß die Äther- und Alkoholdämpfe entweichen können. Nach Verschluß der Flaschen mit Parafilm können die so getrockneten Zellen bei Bedarf mehrere Wochen bis zur Messung bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Für die Messungen wurden die fixierten Zellen in 2 ml n NaOH pro Kulturflasche gelöst (48 Stunden bei Zimmertemperatur). Dann wurden nach Bedarf entnommen: für die Proteinbestimmung nach LOWRY (s. Seite 18) 0,2 ml, für die Liquid-Szintillationszählung (s.u.) 0,4 ml und für die photometrische Melaninbestimmung (s. Seite 22-24) ca. 1 ml.

Zur Liquid-Szintillationszählung wurde ein von BRAY [8] angegebener Liquid-Szintillator für wäßrige Lösungen verwendet.

Zusammensetzung:

Naphthalin	60,0 g
PPO (Packard)	4,0 g
POPOP (Packard)	0,2 g
Methanol	100,0 ml
Äthylenglykol	20,0 ml
Dioxan	ad 1000,0 ml

Pro Meßprobe wurden 0,4 ml der Zellösung (n NaOH) in 10 ml Liquid-Szintillator gegeben. Die Proben wurden 2 x 50 oder 2 x 20 Minuten im Packard-Tri-Carb-Liquid-Szintillationszähler (Modell 574) gemessen. Der Quencheffekt von 0,4 ml n NaOH war vorher durch Einsetzen einer bekannten Menge ^{14}C-markierter Benzoesäure (0,01 µC pro Meßprobe) bestimmt worden. Es hatte sich ein Faktor von 1,21 ergeben, mit dem die in Anwesenheit von NaOH gemessenen Werte multipliziert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellvermehrung

Schon die einfache Beobachtung des HARDING-PASSEY-Melanoms in der Zellkultur (makroskopische Betrachtung des Zellrasens an der Wand der Kulturflasche; Mediumverbrauch, kenntlich an der durch saure Stoffwechselprodukte bedingten Gelbfärbung des Indikators Phenolrot; Zeiten für Mediumwechsel und Subkultivierung) ließ erkennen, daß diese Tumorzellen sich relativ langsam vermehren. Im Oktober 1967 durchgeführte Zählungen lebender Zellen (Auswertung von fünf mit dem Kreuztisch eingestellten Gesichtsfeldern, s. Seite 17-18) ergaben für die Verdopplung der Zellzahl eine Zeit von T = 125 Stunden (zum Vergleich: die schnellwachsenden EHRLICH-Aszitestumorzellen verdoppeln ihre Zahl in 16 Stunden [68]). Parallel dazu durchgeführte Proteinbestimmungen ganzer Kulturen (s. Seite 18) bestätigen dieses Resultat (Abb. 10, Kurven (2) und (3)).

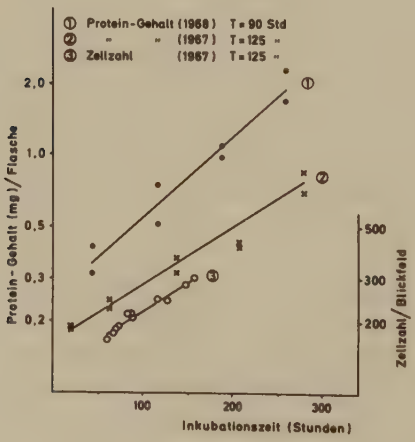

Abb. 10

Wachstumskurven von sich asynchron vermehrenden Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms. Übereinstimmung der durch Zellzählung (3) und Proteinbestimmung (2) ermittelten Verdopplungszeit.

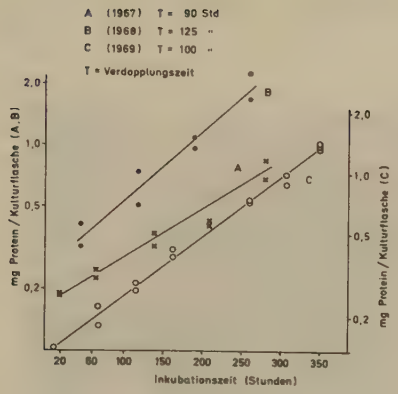

Abb. 11

Durch Proteinbestimmung im Zeitraum von 1967 bis 1969 ermittelte Wachstumskurven von sich asynchron vermehrenden Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms. Über 2 Jahre gleichbleibende Vermehrungsgeschwindigkeit.

Die Protein-Verdopplungszeit wurde 1967, 1968 und 1969 je einmal bestimmt und hat sich im Laufe dieser Zeit nicht wesentlich verändert (Abb. 11).

.2 Tumorogenität von HARDING-PASSEY-Melanomzellen nach Wachstum in Zellkultur

Durch die subkutane Injektion von Kulturzellsupensionen in NMRI-Mäuse (s. auch Methodik, Seite 19) sollte festgestellt werden, ob die Melanomzellen nach Isolierung und Wachstum in künstlichen Nährmedien ihre ursprünglichen Tumoreigenschaften bewahrt hatten. Insgesamt wurden 58 Mäuse geimpft. In 21 Fällen (= 36 %) entwickelten sich Melanome (Abb. 12).

Jahr	Anzahl der geimpften Mäuse	Anzahl der Mäuse mit Tumoren	Tumorhäufigkeit in %
1967	14	4	
1968	37	14	
1969	7	3	
Gesamt	58	21	36

Abb. 12

Melanom-Häufigkeit bei NMRI-Mäusen nach subkutaner Injektion von 1×10^5 Kulturzellen des HARDING-PASSEY-Melanoms in 0,5 ml Medium.

Sämtliche Tumoren waren in allen Bereichen tiefschwarz pigmentiert (Abb. 13).

Abb. 13 Melanom, 6 Monate nach subkutaner Injektion 1×10^5 Kulturzellen des HARDING-PASSEY-Melanoms.

Das Wachstum war in Übereinstimmung sowohl mit der Literatur [4,33,72] über den transplantierten Tumor als auch mit den Daten aus der Zellkultur (s.o., Seite 28 und 29) sehr langsam. Die Zeit bis zum Sichtbarwerden der ersten Zeichen einer erfolgreichen Impfung betrug mindestens 6 bis 8 Wochen, in einem Fall sogar 9 Monate. Diese gegenüber der Tumorübertragung mit der Trokartechnik verlängerte Latenzzeit ist durch relativ geringe Zellzahl und eine mögliche Zellschädigung bei der Injektion von Kulturzellsuspensionen zu erklären. Das weitere Wachstum der Melanome entsprach den Literaturangaben: ca. 4 Monate nach Sichtbarwerden hatte der Tumor einen Durchmesser von mehreren Zentimetern erreicht und begann dann meist zu exulzerieren. Nur in einem Fall wurde ein relativ rasches Wachstum beobachtet: bereits 3 Monate nach der Impfung hatte der Tumor eine Größe von 5 x 3 x 2,5 cm erreicht. Das Gewicht der Maus betrug zu diesem Zeitpunkt lebend 83,5 g, das

Gewicht des Tumors, gewogen nach der Operation, 35,6 g.

Fast alle Tumoren waren gegen die Unterlage verschieblich, solide und von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. Metastasen konnten weder in den regionären Lymphknoten noch in Leber oder Lunge gefunden werden. Diese Befunde entsprechen ebenfalls den Literaturangaben [4].

3.3 Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie

Von 1967 bis 1969 wurden wiederholt Chromosomenpräparationen von HARDING-PASSEY-Melanomzellen durchgeführt und Präparate aus verschiedenen Aufarbeitungen (s. Methodik Seite 19 - 20) ausgewertet. Dabei zeigte sich, daß sowohl in der Zahl pro Metaphase als auch in der Morphologie der Chromosomen Unterschiede zum normalen Chromosomensatz der Maus vorhanden waren. Eine normale somatische Zelle der Maus hat 40 Chromosomen im diploiden (2n) Satz, welche sämtlich von telozentrischer oder akrozentrischer Form sind, d.h., hufeisenförmig aussehen [42]. Die Auswertung von 300 Metaphasen der Melanomzellen zeigte eine im Vergleich zu Normalzellen stärkere Streuung der Chromosomenzahl, wobei in der Verteilungskurve ein Maximum bei 60 Chromosomen pro Metaphase liegt, was einem triploiden Chromosomensatz entspricht (s. Abb. 14).

Die Chromosomenmorphologie ist bei den Melanomzellen in der Weise verändert, daß neben den in den Mauszellen normalerweise vorhandenen telo- und akrozentrischen auch metazentrische, submetazentrische und subtelozentrische Chromosomen vorkommen, und zwar in einer Anzahl, die bei den "triploiden" Zellen zwischen 12 und 20 liegt, mit einem Maximum in der Verteilungskurve bei 17 Chromosomen (s. Abb. 15).

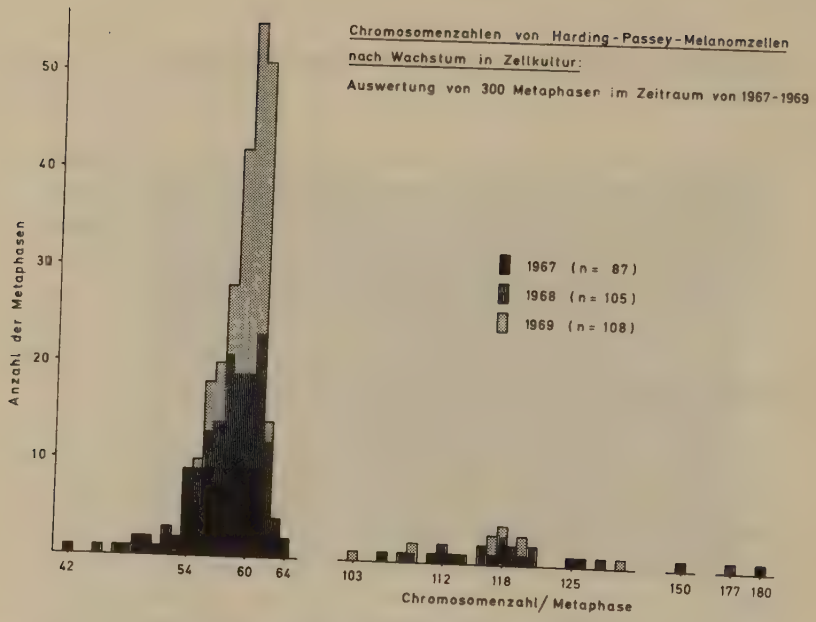

Abb. 14 Anzahl der Chromosomen pro Metaphase.

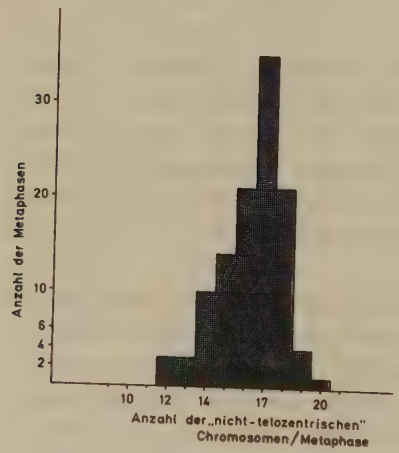

Abb. 15

Anzahl der metazentrischen, submetazentrischen und subtelozentrischen (= "nicht telo- oder akrozentrischen") Chromosomen von Kulturzellen des HARDING-PASSEY-Melanoms. Auswertung von 112 "triploiden" Metaphasen.

Mit sehr großer Regelmäßigkeit (in über 90 %) findet sich in den "triploiden" Metaphasen je ein, in den "hexaploiden" Metaphasen (ca. 120 Chromosomen = 6n) je zwei subtelozentrische Chromosomen.

Die aufgezeigten Besonderheiten des Chromosomensatzes machen es möglich, die HARDING-PASSEY-Melanomzellen allein mittels der chromosomalen Charakteristika von anderen Maustumorzellen, z.B. den EHRLICH-Aszitestumorzellen [68], zu unterscheiden, wobei insbesondere das regelmäßig vorkommende subtelozentrische Chromosom (s. Pfeil in Abb. 16) als "Marker"-Chromosom angesehen werden kann.

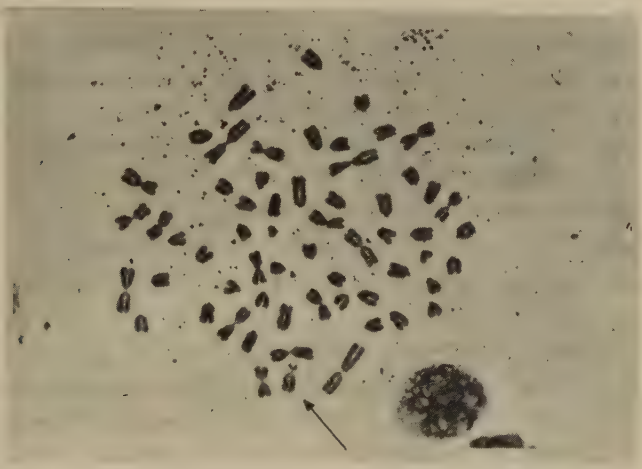

Abb. 16 Metaphasenplatte einer Kulturzelle des HARDING-PASSEY-Melanoms. Chromosomen-Gesamtzahl: 60, Summe der metazentrischen, submetazentrischen und subtelozentrischen Chromosomen: 18; das subtelozentrische Chromosom ist mit einem Pfeil markiert. Man beachte auch die verstreut liegenden Melaningranula.

3.4 Tyrosinstoffwechsel und Melaninsynthese von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur

Die Aminosäuren Tyrosin und Leucin sind Bestandteile aller Zellproteine. Protein-synthetisierende d.h. lebende und sich vermehrende Zellen in Zellkultur bauen die im Medium vorhandenen Aminosäuren in ihre Proteine ein [19]. Werden dem Medium radioaktive Aminosäuren zugesetzt, so sind die daraus aufgebauten Proteine ebenfalls radioaktiv. Im Unterschied zum Leucin wird Tyrosin nicht nur zur Proteinsynthese, sondern auch zum Aufbau von Melanin verwendet. Daher ist bei melaninsynthetisierenden Zellen nur ein Teil des eingebauten Tyrosins im Protein, ein weiterer Teil oder gar der Rest dagegen im Melanin zu finden.

3.41 Wirkung von Actidion

Wenn es gelingt, bei Melanomzellen die Proteinsynthese selektiv zu hemmen, ohne daß die Melaninsynthese beeinträchtigt wird, so muß der Einbau von Tyrosin weniger stark gehemmt sein als der von Leucin. Dies sollte mit dem Proteinsynthesehemmstoff Actidion versucht werden.

Actidion µg/ml	Leucin-^{14}C		Tyrosin-^{14}C	
	Ipm/Kultur	% Hemmung	Ipm/Kultur	% Hemmung
-	1055 ± 1	0	616 ± 21	0
0,04	556 ± 13	47	289 ± 43	53
0,2	211 ± 15	80	194 ± 19	69
1,0	68 ± 2	94	55 ± 0	91
5,0	24 ± 9	98	27	96
25,0	1 ± 1	100	-	-

Abb. 17 Der Einfluß von Actidion auf den Einbau von L-Leucin- und L-Tyrosin-^{14}C in die säureunlösliche und lipidextrahierte Fraktion von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur.

Das Ergebnis dieses Experimentes (s. Abb.17) zeigt, daß

es gelingt, den Einbau von Leucin durch Actidion konzentrationsabhängig zu inhibieren, jedoch ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung des Leucin- und des Tyrosineinbaus, so daß angenommen werden muß, daß Protein- und Melaninsynthese durch Actidion gleichermaßen inhibiert werden.

3.42 Wirkung von Phenylthioharnstoff

Mit dem Tyrosinasehemmstoff Phenylthioharnstoff (PTH) sollte der umgekehrte Effekt erreicht werden, nämlich die selektive Hemmung der Melaninsynthese ohne oder mit gringer Beeinträchtigung der Proteinsynthese. Aus Abb. 18 ist die relativ stärkere Hemmung des Tyrosineinbaus unter der Einwirkung von 3×10^{-4} Mol/l PTH ersichtlich, wobei jedoch eine gewisse Hemmung des Leucineinbaus ebenfalls zu beobachten ist.

Experiment	Phenylthioharnstoff	Leucin-^{14}C		Tyrosin-^{14}C	
		Ipm/Kultur	% Hemmung	Ipm/Kultur	% Hemmung
A	- (Kontrolle)	6206 ± 234	-	967 ± 141	-
	3×10^{-4} M	961 ± 86	20	662 ± 62	32
B	- (Kontrolle)	1628 ± 228	-	1564 ± 6	-
	3×10^{-4} M	1376 ± 235	16	695 ± 8	56

Zell-Kulturen (Exp. A : 280 µg Protein/Kultur ; Exp. B : 400 µg Protein/Kultur) wurden mit 0.05 µC (130 µg) L-Leucin-^{14}C oder 0.05 µC L-Tyrosin-^{14}C (90 µg) 30 Stunden bei 37°C in 5 ml Medium inkubiert.
Jedes Einbau-Resultat ist das arithmetische Mittel aus den Meßwerten von 2 Kulturen

Abb. 18 Der Einfluß von Phenylthioharnstoff auf den Einbau von L-Leucin- und L-Tyrosin-^{14}C in die säureunlösliche und lipidextrahierte Fraktion von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur.

Um weiter zu sichern, ob die bevorzugte Hemmung des Tyrosineinbaus auf eine Hemmung der Melaninsynthese zurückgeführt werden kann, wurden auch photometrische Melaninbestimmungen ganzer Kulturen durchgeführt (s. Methodik Seite 22-24). Ein Vergleich PTH-inkubierter Kulturen mit normal inkubierten Kontrollen ergab, daß der

spezifische Melaningehalt, gemessen an der spezifischen (auf 1 mg Protein bezogenen) Extinktion bei 400 nm nach 30-stündiger Inkubation mit PTH signifikant vermindert war (s. Abb. 19).

number of cultures	Phenylthiourea (3×10^{-4} M)	Incubation-time(hours)	E_{400}/ mg Protein $\pm$ S.D.
6	- (control)	30	0.460 ± 0.045
6	+	30	0.356 ± 0.015

Abb. 19 Der Einfluß von Phenylthioharnstoff auf den Melaningehalt von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur. Gemessen wurde die spezifische (auf 1 mg Protein bezogene) Extinktion bei 400 nm.

Somit scheint erwiesen, daß PTH die Melaninsynthese in der Zellkultur inhibiert. Es wird angenommen, daß dieser Hemmeffekt auf eine intrazelluläre Inaktivierung der Tyrosinase zurückzuführen ist.

3.43 Wirkung von Dopa

Die Tyrosinase ist ein kupferhaltiges Protein, welches in seiner enzymatischen Wirkung durch Dopa aktiviert werden soll [51]. Da das verwendete Medium kein Dopa enthält, ist es denkbar, daß die Aktivität der Tyrosinase von Melanomzellen durch Zugabe von Dopa zum Medium gesteigert werden kann. Bei der resultierenden Erhöhung der Melaninsynthese müßte sich eine Steigerung des Tyrosineinbaus nachweisen lassen oder, falls dies nicht eintritt, zumindest eine Erhöhung der Extinktion bei 400 nm als Zeichen dafür, daß das im Medium angebotene Dopa zur Melaninsynthese mitverwendet wurde.

Aus Abb. 20 geht hervor, daß dieser stimulierende Effekt nicht eintritt. Bis zu einer Konzentration von 2×10^{-5} Mol/l Dopa ist weder eine Steigerung des Tyrosineinbaus noch eine Erhöhung des Melaningehaltes der Melanomzellen

zu beobachten. Bei einer Konzentration von 2 x 10^{-4} Mol/l Dopa ist jedoch eine Hemmung sowohl des Tyrosin- als auch des Leucineinbaus festzustellen, was mit einer toxischen Wirkung von Dopa bzw. Autoxydationsprodukten des Dopa erklärt werden kann.

3.44 Wirkung von Cu^{++}-Ionen

Unter der Vorstellung, daß das im Medium nur in Spuren vorhandene Kupfer für eine optimale Aktivität der Tyrosinase unzureichend sein könnte, wurde versucht, durch Zugabe von Cu^{++}-Ionen eine Steigerung der Melaninsynthese zu erreichen. Die erwartete Steigerung des Tyrosineinbaus trat jedoch nicht ein (s. Abb. 20). Auch der Melaningehalt der Zellen war nach Inkubation mit Cu^{++}-Ionen nicht erhöht.

3.45 Wirkung von Dopa + Cu^{++}-Ionen

Schließlich wurden Dopa und Cu^{++}-Ionen in Kombination verwendet. Hierbei trat der "toxische Dopa-Effekt" schon bei Inkubation mit 2 x 10^{-5} Mol/l Dopa auf, einer Konzentration also, bei der Dopa ohne zugesetzte Cu^{++}-Ionen noch keine toxische Wirkung zeigte (s. Abb. 20). Somit ist es unwahrscheinlich, daß die Melaninsynthese dieser Zellen durch den Gehalt von Dopa oder Cu^{++}-Ionen im Medium limitiert wird.

3.46 Wirkung von Tyrosin

Der ausreichende Gehalt des Mediums an Tyrosin (oder Vorstufen des Tyrosins) ist eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von Melanin. Um zu klären, ob der Tyrosingehalt des verwendeten Kulturmediums (18 mg/l) einen begrenzenden Faktor in der Melaninsynthese von HARDING-PASSEY-Melanomzellen darstellt, wurden Kulturen mit einem Medium von 6-facher Tyrosinkonzentration (6 x 10^{-4} Mol/l) inkubiert. Im Vergleich zu normal

inkubierten Kontrollen zeigte sich kein Unterschied im Melaningehalt (Extinktion bei 400 nm).

		Leucin- ^{14}C		Tyrosin- ^{14}C	
Exp.	Zusatz	Ipm/Kultur	% Hemmung	Ipm/Kultur	% Hemmung
A	- (Kontrolle)	859 ± 72	-	687 ± 34	-
	DOPA 2×10^{-6} M	886 ± 19	-	629 ± 34	-
	" 2×10^{-5} M	824 ± 4	-	645 ± 40	-
	" 2×10^{-4} M	539 ± 33	37	394 ± 1	43
	$CuCl_2$ 1×10^{-7} M	796	-	619 ± 9	-
	" 1×10^{-6} M	807 ± 36	-	612 ± 7	-
	" 1×10^{-5} M	789 ± 66	-	641 ± 3	-
	DOPA 2×10^{-5} M + $CuCl_2$ 1×10^{-7} M	470 ± 93	45	399 ± 70	42
B	- (Kontrolle)	874 ± 105	-	533 ± 16	-
	DOPA 1×10^{-4} M	622 ± 16	29	553	-
	$CuCl_2$ 1×10^{-6} M	916 ± 63	-	588 ± 82	-
	DOPA 1×10^{-4} M + $CuCl_2$ 1×10^{-6} M	418 ± 42	52	264 ± 74	51

Zell-Kulturen (250 µg Protein/Kultur) wurden jeweils 24 Stunden mit 0,05 µC (130 µg) L-Leucin- ^{14}C oder 0,05 µC (90 µg) L-Tyrosin- ^{14}C und verschiedenen Zusätzen in 5 ml Medium bei 37° C inkubiert.

Jedes Einbau-Resultat ist das arithmetische Mittel aus den Meßwerten von 2 Kulturen.

Abb. 20 Der Einfluß von DL-Dopa und $CuCl_2$ - allein und in Kombination - auf den Einbau von L-Leucin- und L-Tyrosin- ^{14}C in die säureunlösliche und lipidextrahierte Fraktion von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur.

3.47 DNS-Synthese und Melaningehalt

Wie bereits erwähnt, gelten Protein- und DNS-Synthese ganzer Kulturen als Parameter der Zellvermehrung. In der Kausalkette der zellulären Vermehrungsvorgänge steht dabei die Zunahme der DNS an erster Stelle, denn zum einen ist das Vorhandensein von DNS eine - wenn auch indirekte - Vorbedingung für den Ablauf der Proteinsynthese, zum anderen muß die Menge an DNS als Träger der genetischen Information für jeden Zellteilungsvorgang exakt verdoppelt werden, wenn die genetischen Eigenschaften der Mutterzelle unverändert auf die beiden Tochterzellen übertragen werden sollen. Deshalb kann die DNS-Synthese als Vorläufer der übrigen Vermehrungsvorgänge angesehen werden und ist somit gleichsam ein Gradmesser der "Vermehrungsintention" von Zellen.

Die Kontrolle der DNS-Synthese durch Messung des Einbaus von Thymidin-^{14}C bei gleichzeitiger Kontrolle des Melaningehaltes durch Messung der Extinktion bei 400nm sollte darüber Aufschluß geben, ob eine Beziehung zwischen der Zellvermehrungstendenz und einer spezifischen Zellfunktion, nämlich der Melaninsynthese von HARDING-PASSEY-Melanomzellen, besteht.

Aus Abb. 21 wird deutlich, daß der zunächst (3 Tage nach Subkultivierung) kaum meßbare relative Melaningehalt progressiv ansteigt, während der zunächst konstante relative Thymidineinbau gegen Ende der Inkubationszeit absinkt.

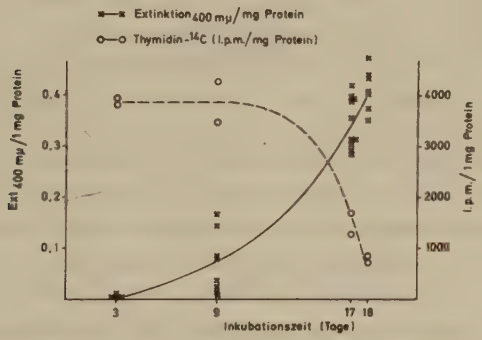

Abb. 21 Melaningehalt und DNS-Syntheserate von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in Kultur zu verschiedenen Zeiten nach einer Subkultivierung. Messung der spezifischen Extinktion bei 400 nm sowie des spezifischen Einbaus Thymidin-^{14}C (Berechnung auf 1 mg Protein).

4 Diskussion

Die relativ langsame Vermehrung der HARDING-PASSEY-Melanom (HPM) -Zellen in der Zellkultur mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von T = 110 Stunden stimmt gut mit den Literaturangaben über das langsame Wachstum der bisher von Maus zu Maus transplantierten HPM-Tumoren überein [4,33,72].

Die bei der subkutanen Impfung von NMRI-Mäusen mit Suspensionen von HPM-Kulturzellen erzielte Tumorquote von 36 % ist nicht sehr hoch, was durch relativ geringe Zahl und Vitalität der Zellen in der Impfsuspension bedingt sein kann. Die durch Impfung hervorgerufenen Tumoren zeigten die in der Literatur über das HPM angegebenen Eigenschaften [2,4,33,72]: langsames, lediglich verdrängendes Wachstum ohne Infiltration in die Nachbargewebe, fehlende Metastasierungsneigung und einheitlich tiefschwarze Pigmentierung. Es ergibt sich das Bild eines relativ gutartigen und differenzierten Tumors, der erst durch seine Größe und Neigung zur Ulzeration im späten Stadium für den Wirtsorganismus letal ist. Alle wesentlichen Eigenschaften der Tumorogenität des HPM sind somit in der Zellkultur erhalten geblieben.

Tumorzellen unterscheiden sich von Normalzellen der betreffenden Spezies relativ oft durch Veränderungen in der Zahl und Morphologie der Chromosomen. Es können Chromosomen fehlen oder zusätzliche Chromosomen vorhanden sein. Besonders in Zellkultur entwickeln sich oft höhere Ploidiegrade, d.h.,Zellen mit einem ganzzahligen Vielfachen der normalen Chromosomenzahl (Normalzahl für somatische [= Körper-] Zellen ist 2 n = diploider Chromosomensatz). Die morphologischen Chromosomenveränderungen sind mannigfaltiger Art und führen gelegentlich zum Auftreten von Chromosomen, die für den betreffenden Tumor als charakteristisch angesehen werden können. Typisch für Tumorzellen ist weiterhin die gegenüber Nor-

malzellen vergrößerte Streuung von Zahl und Morphologie der Chromosomen, d.h., nicht alle Zellindividuen gleichen einander vollständig, sondern es finden sich mehr oder weniger große Abweichungen von einem mittleren Wert.

Die HPM-Zellen zeigen alle erwähnten chromosomalen Charakteristika von Tumorzellen (s. Seite 31-33 und Abb. 14-16):

1. Abweichung vom normalen diploiden (2n = 40) Chromosomensatz der Maus: die HPM-Zellen sind zumeist triploid (3n = 60), in einer Minderzahl treten höhere Ploidiegrade (6n = 120 und höher) auf.
2. Abweichungen von der normalen Morphologie: es treten metazentrische und submetazentrische und bei den triploiden Zellen in über 90 % der Fälle je ein, bei den hexaploiden (6n = 120) meist je zwei subtelozentrische Chromosomen auf; letztere können als "Marker"-Chromosomen angesehen werden.
3. Streuung sowohl der Gesamtzahl als auch der morphologisch veränderten Chromosomen pro Metaphase.

Gerade wegen der mannigfaltigen Abweichungen von der Norm ist es bemerkenswert, daß sich dieses Chromosomenbild während der Beobachtungszeit von zwei Jahren nicht wesentlich verändert hat. Dies ist neben der erhaltenen Tumorogenität und der konstanten Vermehrungsgeschwindigkeit ein weiteres Indiz für die "Stabilität" der HPM-Zellen in Kultur.

Es wurde gezeigt, daß die Proteinsynthese von HPM-Zellen in Zellkultur durch Actidion konzentrationsabhängig gehemmt werden kann (s. Seite 34-35 und Abb. 17). Dabei wird der Einbau von Leucin- und Tyrosin-^{14}C gleichermaßen inhibiert. Es muß daher angenommen werden, daß zugleich mit der Proteinsynthese auch die Melaninsynthese gehemmt wird. GORTNER [29] gelang bereits 1911 die Isolierung eines Melanoproteins aus der Wolle des schwarzen Schafs. Nach Abderhalden und Guggenheim [1] enthält natürliches Melanin Polypeptidketten, die in synthetischem

Melanin nicht vorkommen. Es ist möglich, daß unter physiologischen Bedingungen parallel mit der Melaninsynthese die Bildung von Proteinen ablaufen muß. Melanin und Protein werden dann in den Melanosomen zum eigentlichen Pigment, einem Melanoproteid, verkoppelt. Die gleich starke Hemmung des Leucin- und Tyrosin-Einbaus in die Melanomzellen durch Actidion wäre dadurch erklärbar.

Dagegen ist es auch unter dieser Voraussetzung denkbar, daß -umgekehrt- die Melaninbildung ohne Beeinträchtigung der Proteinsynthese gehemmt werden kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß der Tyrosinaseinhibitor Phenylthioharnstoff bei HPM-Zellen in Kultur auf den Einbau von Tyrosin eine stärkere Hemmwirkung ausübt als auf den Einbau von Leucin (Abb. 18, Seite 35). Allerdings hat Phenylthioharnstoff offensichtlich auch eine allgemein zellschädigende Wirkung, denn neben einer gewissen Hemmung des Leucineinbaus ist vielfach ein partieller Zellverlust durch Ablösung der Zellen von der Wand der Kulturflasche beobachtet worden (Kontrolle durch Proteinbestimmung nach LOWRY).

3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) ist als ein Aktivator isolierter Tyrosinase bekannt [51]. Die Unwirksamkeit von Dopa als Stimulator der Melaninsynthese in Kulturen von lebenden HPM-Zellen könnte durch zu geringe Aufnahme des Stoffes in den intrazellulären Raum bedingt sein; möglicherweise ist aber auch das bei der Melaninsynthese durch Oxydation von Tyrosin als Zwischenprodukt intrazellulär entstehende Dopa für eine optimale Aktivierung (durch diesen Mechanismus) bereits ausreichend. Es ist jedoch keineswegs sicher, daß in dem vorliegenden System (HPM-Zellen in Kultur) die Tyrosinaseaktivität überhaupt der begrenzende Faktor in der Melaninsynthese ist.

Bei einer Konzentration von über 1×10^{-5} Mol/l im Kulturmedium bewirkte Dopa eine Hemmung sowohl des Leucin- als auch des Tyrosineinbaus in HPM-Zellen (Abb. 20, Seite 38). Wenn dem Medium Cu^{++}-Ionen zugesetzt waren, trat derselbe "toxische Dopa-Effekt" schon bei zehnfach ge-

ringerer Dosierung von Dopa auf, einer Konzentration, in der Dopa allein noch keine Hemmung des Aminosäureneinbaus verursachte. Es wird angenommen, daß es sich um eine toxische Wirkung von Autoxydationsprodukten des Dopa handelte, zumal diese Wirkung durch die Anwesenheit von Cu^{++}-Ionen, welche bekanntlich Autoxydationsvorgänge katalysieren, gefördert wurde.

Durch Zugabe von Cu^{++}-Ionen ($CuCl_2$) zum Kulturmedium konnte der Einbau von Tyrosin-^{14}C in die Melanomzellen nicht gesteigert werden (Abb. 20, Seite 38). Auch der relative Melaningehalt der Kulturen wurde durch Cu^{++}-Ionen nicht über das Niveau der Kontrollen angehoben. Offensichtlich sind die im Medium (durch den Zusatz von Serum) vorhandenen Spuren von Kupfer für die Aktivierung der Tyrosinase ausreichend, und eine weitere Steigerung der Aktivität läßt sich durch Zugabe von Kupfer im Überschuß nicht mehr erreichen. Also stellt der Kupfergehalt des Mediums keinen begrenzenden Faktor in der Melaninsynthese dar.

Das Ausbleiben einer verstärkten Melaninsynthese nach Anreicherung des Kulturmediums mit Tyrosin (6×10^{-4} Mol/l) erlaubt den Schluß, daß auch der Tyrosingehalt die Melaninsynthese nicht limitiert. Weitere Hinweise stützen diese Ansicht:

1. Von dem angebotenen L-Tyrosin-^{14}C wurde jeweils nur ein sehr kleiner in das Melanin + Protein eingebaut.

2.In vivo kann trotz gleicher Substratversorgung (= Ernährung) eine sehr unterschiedliche Aktivität in der Pigmentbildung beobachtet werden, wie z.B. beim Menschen vor oder nach Insolation, beim Weißen oder Neger, beim Gesunden oder beim Kranken mit Morbus Addison.

3. Beim HPM in Zellkultur wurde gerade kurz nach einer Subkultivierung, wenn wenig Zellen in der Kulturflasche sind und damit das Angebot von Substraten (also auch Tyrosin) relativ besonders reichlich ist, keine Vermehrung, sondern eher eine Verminderung des Anteils pigmenthaltiger Zellen beobachtet; dagegen war einige Zeit nach der

Subkultivierung beim zunehmenden Dichterwerden des Zellrasens trotz der damit zwangsläufig verbundenen Substratverknappung eine relativ vermehrte Melaninbildung zu erkennen (s. auch Abb. 1).

Die Vermehrung des zunächst sehr geringen Anteils pigmenthaltiger Zellen beim Dichterwerden des Zellrasens einige Zeit nach einer Subkultivierung des HPM war zuerst durch mikroskopische Betrachtung festgestellt worden (Abb. 1). Es sieht so aus, als ob die melaninhaltigen Zellen (Melanozyten) auch bedeutend größer sind als ihre unpigmentierten Vorstufen (Melanoblasten). Diese Beobachtungen ließen vermuten, daß mit einer vermehrten Melaninbildung eine Zellteilungshemmung verbunden ist und gaben die Anregung zur Kontrolle der DNS-Synthese (s.u.).

Die gleichzeitige Kontrolle des Einbaus von Thymidin-^{14}C und der Extinktion bei 400 nm als Maß für den Melaningehalt ergab den interessanten Befund einer Hemmung der DNS-Synthese bei größerer Zelldichte, während der relative Melaningehalt stark zunimmt (s. Abb. 21, Seite 39). Dieser Befund ist möglicherweise der Ausdruck einer durch gegenseitige Beeinflussung der dicht nebeneinanderliegenden Zellen ausgelösten Differenzierung von Melanoblasten zu Melanozyten. Eine andere Erklärung für die verstärkte Melaninbildung bei großer Zellzahl pro Kultur könnte das verstärkte Wirksamwerden eines Serumfaktors sein, der durch den Zellstoffwechsel oder allein durch die Inkubationstemperatur von 37°C rasch inaktiviert wird: bei großer Zellzahl muß häufiger das Medium gewechselt werden, so daß immer wieder neuer Serumfaktor zugeführt wird.

In weiteren Untersuchungen mit erhöhtem Serumgehalt des Kulturmediums soll die Frage des Serumfaktors geklärt werden. Zudem soll durch kinematographische Beobachtung lebender Zellen des HARDING-PASSEY-Melanoms mit Hilfe

starker Zeitraffung gezeigt werden, ob bei einzelnen Zellindividuen das Einsetzen der Melaninbildung tatsächlich mit einer Zellteilungshemmung und gleichzeitiger Größenzunahme verbunden ist. Nicht zuletzt soll auch geprüft werden, ob das Melanozyten-stimulierende Hormon der Hypophyse (MSH) die Melaninbildung von HARDING-PASSEY-Melanomzellen in der Zellkultur steigern kann.

5 Zusammenfassung

Das 1925 spontan entstandene und seitdem von Maus zu Maus transplantierte HARDING-PASSEY-Melanom (HPM) ist ein langsam verdrängend wachsender, nicht metastasierender, pigmenthaltiger Tumor.

Im April 1967 wurden Zellen des HPM von SCHACHTSCHABEL isoliert und unter sterilen Kautelen in die Zellkultur überführt und seitdem in Zellkultur gehalten.

Die Vermehrung der HPM-Zellen in Zellkultur ist mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von T=110 Std. als langsam zu bezeichnen.

Nach subkutaner Injektion von Kulturzellsuspensionen des HPM entstanden in 36 % der Fälle Melanome, die alle oben genannten Eigenschaften des ursprünglichen Mäusetumors aufwiesen.

Etwa 90 % der HPM-Zellen in Zellkultur haben einen triploiden Chromosomensatz mit durchschnittlich 60 Chromosomen pro Metaphase. Pro triploide Metaphase wurden durchschnittlich 17 von der Morphologie normaler Mäusechromosomen abweichende (meta- und submetazentrische) Chromosomen identifiziert. In über 90 % der Metaphasen wurde ein charakteristisches subtelozentrisches "Marker"-Chromosom beobachtet.

Es wurde eine photometrische Methode zur Bestimmung des Melaningehaltes von nukleotid- und lipidextrahierten und in n NaOH gelösten Zellkulturen ausgearbeitet. Als Referenz diente sowohl "synthetisches" Melanin, welches aus Dopa dargestellt, als auch "natürliches" Melanin, welches aus HPM-Tumoren isoliert wurde. Die Extinktions-Kurven (von 260 bis 600 nm) beider Melanine zeigten den gleichen Verlauf. Als Maß für den Melaningehalt wurde die Extinktion bei 400 nm gewählt, da bei dieser

Wellenlänge unpigmentierte Zellen nahezu keine Extinktion aufwiesen.

Durch Zugabe von Actidion zum Kulturmedium ist die Proteinsynthese von HPM-Zellen konzentrationsabhängig hemmbar, wobei offensichtlich die Melaninsynthese ebenfalls gehemmt wird (Kontrolle durch Einbau von Leucin- und Tyrosin-^{14}C).

Durch Zugabe des Tyrosinase-Inhibitors Phenylthioharnstoff zum Kulturmedium ist die Melaninsynthese von HPM-Zellen hemmbar (Kontrolle durch Einbau von Leucin- und Tyrosin-^{14}C sowie durch Messung der Extinktion bei 400 nm).

Durch Zugabe von Dopa, Cu^{++}-Ionen oder Tyrosin zum Kulturmedium wurde die Melaninsynthese von HPM-Zellen nicht gesteigert.

Dopa-Konzentrationen im Kulturmedium von über 2×10^{-5} Mol/l haben einen toxischen Effekt auf HPM-Zellen. Dieser Effekt tritt in Anwesenheit von Cu^{++}-Ionen bereits bei geringeren Dopa-Konzentrationen auf.

Bei zunehmender Zelldichte des HPM in Kultur wurde ein Abfall der DNS-Synthese bei gesteigerter Melaninsynthese gefunden. Möglicherweise ist diese Steigerung einer spezifischen Zellfunktion bei herabgesetzter oder gehemmter Zell-Vermehrung der Ausdruck einer stärkeren Differenzierung durch gegenseitige Beeinflussung der dicht nebeneinander liegenden Zellen.

Anerkennung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Dr. D. O. Schachtschabel in der Zeit vom August 1967 bis Dezember 1968 am Institut für Physiologische Chemie II (Direktor: Prof. Dr. F. Zilliken) ausgeführt.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. Schachtschabel für die Überlassung des Themas und für seine Anregungen zur Planung der einzelnen Versuche sowie für seine Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. F. Zilliken danke ich vielmals für das stetige Interesse und die tatkräftige Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ. Für technische Unterstützung danke ich Frau E. Krutzsch, Frau S. Götzfried und Frau M. Steinmeyer.

Literatur

1. Abderhalden, E., und M. Guggenheim: Versuche über die Wirkung der Tyrosinase aus Russula delica auf Tyrosin, tyrosinhaltige Polypeptide und einige andere Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen. Zschr.physiol. Chemie 54, 331 - 353 (1908).
2. Algire,G.H., and F.Y. Legallais: Growth and vascularisation of transplanted mouse melanomas. In: Biology of Melanomas, New York Acad. Sc. (Special publ.) 4, 159-170 (1948).
3. Arnow, L.E.: The preparation of dopa melanin. Science 87, 308 (1938).
4. Atlas of Tumor Pathology, section XII Transplantable and transmissable tumors of animals, Seite 51-56. Veröffentlicht von: Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC 1959.
5. Bickis,I.J., Kennedy,J.C., and J.H. Quastel: Phenylalanine inhibition of tyrosine metabolism in the liver. Nature, London 179, 1124 (1957).
6. Bloch,B.: Chemische Untersuchungen über das spezifische pigmentbildende Ferment der Haut, die Dopaoxydase. Zschr. physiol. Chemie 98, 226-254 (1917).
7. Bloch,B., und F. Schaaf: Pigmentstudien. Biochem. Zschr. 162, 181-206 (1925).
8. Bray,G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid-scintillation-counter. Anal. Chem. 1, 279-285 (1960).
9. Bryan,J.: Studies on clonal cartilage strains I. Exptl. Cell Res. 52, 319-326 (1968).
10. Buonassisi,V., Sato,G., and A.J. Cohen: Hormone producing cultures of adrenal and pituitary origin. Proc. Nat. Ac. Sc. U.S. 48, 1184-1190 (1962).

11. Carrel,A.: Neue Untersuchungen über das selbständige Leben der Gewebe und Organe. Berliner Klinische Wochenschr. 50, No. 24, 1097-1101 (1913).
12. Dorris,F.: Differentiation of pigment cells in tissue cultures of chick neural crest. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34, 448-449 (1936).
13. Dorris,F.: The production of pigment in vitro by chick neural crest. Roux Arch. 138, 323-334 (1938).
14. Dorris,F.: The production of pigment by chick neural crest in grafts to 3-day limb bud. J. Exper. Zool. 80, 315-345 (1939).
15. du Shane,G.P.: The source of pigment cells in Amphibia. Anat. Rec. 60, 62-63 (1934).
16. du Shane,G.P.: An experimental study of the origin of pigment cells in Amphibia. J. Exper. Zool. 72, 1-31 (1935).
17. du Shane,G.P.: The role of embryonic ectoderm and mesoderm in pigment production in Amphibia. J. Exper. Zool. 82, 193-215 (1939).
18. du Shane,G.P.: The development of pigment cells in Vertebrates. In: Biology of Melanomas, New York Acad. Sc. (Special publ.) 4, 1-14 (1948).
19. Eagle,H.: Amino acid metabolism in Mammalian cell cultures. Science 130, 432-437 (1959).
20. Ennis,H.L., and M. Rubin: Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in Mammalian cells. Science 146, 1474-1476 (1964).
21. Fellmann, J.H.: Epinephrine metabolites and pigmentation in the central nervous system in a case of phenylpyruvic oligophrenia. J. Neurol. Psychiat. 21, 58 (1958).
22. Felix,K.: Erfahrungen mit der Funktionsprüfung der Leber durch p-Oxyphenylbrenztraubensäure. Zschr. physiol. Chemie 281, 36-49 (1944).
23. Felix,K., Leonhardi,G., und J.V. Glasenapp: Über Tyrosinosis. Zschr. physiol. Chemie 287, 141-147 (1951).

24. Fischer,A.: A pure strain of cartilage cells in vitro. J.Exptl.Med. 36, 379-384 (1922).
25. Fitzpatrick,T.B.: Albinism. In: The metabolic basis of inherited disease, Mc Graw Hill Book Company 1960. Seite: 273-320.
26. Fölling,A.: Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. Zschr. physiol. Chemie 227, 169 (1934).
27. Garrod,A.E.: The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. Lecture II. Alcaptonuria. Lancet 2, 73 (1908).
28. Goldberg,B., Green,H., and G.J. Todaro: Collagen formation in vitro by established Mammalian cell lines. Exptl. Cell Res. 31, 444-447 (1963).
29. Gortner,R.A.: On two different types of melanin. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 9, 120-121 (1911).
30. Grand,C.G., and Gladys Cameron: Tissue culture studies of pigmented melanomas: Fish, Mouse, and Human. In: Biology of Melanomas, New York Acad. Sc. (Special publ.) 4, 171-176 (1948).
31. Halle,W., und A. Wollenberger: Die Differenzierung isolierter Herzzellen in einem chemisch definierten Nährmedium. Zschr. für Zellforschung 87, 292-314 (1968).
32. Ham,R.G., and G.L. Sattler: Clonal growth of differentiated rabbit cartilage cells. J. Cell Physiol. 72, 109-114 (1968).
33. Harding,H.E., and R.D. Passey: A transplantable melanoma of the mouse. J. Path. & Bact. 33, 417-427 (1930).
34. Harrison,R.G.: Neue Versuche und Beobachtungen über die Entwicklung der peripheren Nerven der Wirbeltiere. Sitz.-Ber. der Niederrh. Ges. für Nat. und Heilkunde zu Bonn (1904).
35. Harrison,R.G.: The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exper. Zool. 9, 787-848 (1910).

36. Harrison,R.G.: Die Neuralleiste. Verh. der Anat. Ges. auf der Vers. in Königsberg 1937 (Anat. Anz. 85, Erg.Heft).

37. Hirsch,H.H.: Tissue autoxydation inhibitors. I. The inhibition of dopa autoxydation by extracts from normal and neoplastic tissues. Cancer Res. 15, 249-255 (1955).

38. Hirschhorn,K.: Procedure - Micro-cultures for chromosome studies. In: Price and Reference Manual 1966, Grand Island Biological Company. Seite: 70.

39. His,W.: Die Entwicklung der ersten Nervenbahnen beim menschlichen Embryo. Arch. für Anat. u. Physiol., Anat. Abtheilg. (1887).

40. His,W.: Zur Geschichte des Gehirns sowie der centralen und peripherischen Nervenbahnen beim menschlichen Embryo. Abh. d. math.-phys. Kl. d. Kgl. sächs. Ges. d. Wiss., Bd. 14 (1888).

41. Holtfreter,J.: Der Einfluß von Wirtsalter und verschiedenen Organbezirken auf die Differenzierung von angelagertem Gastrulaektoderm. Roux Arch. 127, 619-775 (1933).

42. Hsu,T.C., and K. Benirschke: An Atlas of Mammalian Chromosomes, Springer Verlag, New York 1967. Vol I, Folio 17.

43. Jarisch,A.: Über die Bildung des Pigmentes in den Oberhautzellen. Arch. für Dermatol. u. Syphilis 24, 223-233 (1892).

44. Jervis,G.A.: Phenylpyruvic oligophrenia: deficiency of phenylalanine oxidizing system. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 82, 514-515 (1953).

45. Knox,W.E.: Phenylketonuria. In: The metabolic basis of inherited disease, Mc Graw Hill Book Company 1960. Seite 321-382.

46. Kölliker,A.: Über die Entstehung des Pigmentes in den Oberhautgebilden. Zschr. für wiss. Zool. 45, 713 (1887).

47. Kreibich,K.: Über das melanotische Pigment der Epidermis. Arch. für Dermatol. u. Syphilis 118, 837-855 (1913).

48. La Du,B.N.: Alcaptonuria. In: The metabolic basis of inherited disease, Mc Graw Hill Book Company 1960. Seite 394-427.
49. La Du,B.N.: Tyrosinosis. In: The metabolic basis of inherited disease, Mc Graw Hill Book Company 1960. Seite 383-393.
50. Landacre,F.L.: The fate of the neural crest in the head of the Urodels. J. Comp.Neur. 33, 1-43 (1921).
51. Lerner,A.B., Fitzpatrick,T.B., Calkins,E., and W.H. Summerson: Mammalian tyrosinase preparation and properties. J.Biol.Chem. 178, 185-195 (1949).
52. Lerner,A.B., Fitzpatrick,T.B., Calkins,E., and W.H. Summerson: Mammalian tyrosinase: The relationship of copper to enzymatic activity. J. Biol. Chem. 187, 793-802 (1950).
53. Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., and R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
54. Mangold,O.: Experimente zur Analyse der Determination und Induktion der Medullarplatte. Roux Arch. 117, 586-696 (1929).
55. Mason,H.S.: The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. J.Biol. Chem. 172, 83-99 (1948).
56. Medes,G.: Anew error of tyrosine metabolism: tyrosinosis. The intermediary metabolism of tyrosine and phenylalanine. Biochem. J. 26, 917 (1932).
57. Meister,A.: Biochemistry of the Amino Acids II, Academic Press, New York & London, 1965. Seite 920.
58. Miyamoto,M., and T.B. Fitzpatrick: Competitive inhibition of Mammalian tyrosinase by phenylalanine and its relationship to hair pigmentation in phenylketonuria. Nature, London, 179, 199 (1957).

59. Neubauer,O.: Intermediärer Eiweißstoffwechsel. In: Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, 5. Band, S. 671 (1928).

60. Oyama,V.J., and H. Eagle: Measurement of cell growth in tissue cultures with a phenol reagent (Folin-Ciocalteau). Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 91, 305-307 (1956).

61. Platt,J.: Ontogenetische Differenzierung des Ektoderms in Necturus. Arch. für mikroskop. Anat. 43, 911-966 (1894).

62. Raper,H.S.: The aerobic oxidases. Physiol.Rev. 8, 245-282 (1928).

63. Raven,C.P.: Zur Entwicklung der Ganglienleiste. I. Die Kinematik der Ganglienleistenentwicklung bei den Urodelen. Roux Arch. 125, 210-292 (1931).

64. Raven,C.P.: Zur Entwicklung der Ganglienleiste. II. Über das Differenzierungsvermögen des Kopfganglienleistenmaterials von Urodelen. Roux Arch. 129, 179-198 (1933).

65. Rawles,M.E.: Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. Physiol. Zool. 20,

66. Sato,G.H., and Y. Yasumura: Retention of differentiated function in dispersed cell culture. Transact. New York Acad. Sc. 28, 1063-1079 (1966).

67. Schachtschabel,D.O., and Janice J. Ferro: The effect of 4-Aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine and Guanine on Ehrlich ascites tumor cells in culture. Exptl. Cell Res. 48, 319-326 (1967).

68. Schachtschabel et al.: In Vorbereitung.

69. Stanbury,J.B.: Familial Goiter. In: The metabolic basis of inherited disease, Mc Graw Hill Book Company 1960. Seite 273-320.

70. Starck,D.: Embryologie, ein Lehrbuch auf allgemein biologischer Grundlage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1965. Seite 385-408.

71. Stone,L.S.: Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in the formation of head skeleton and loose connective tissue in Rana palustris. Roux Arch. 118, 40-77 (1929).

72. Sugiura,K.: The effects of various physical and chemical factors on transplantable mouse melanoma. In: Biology of Melanomas, New York Acad. Sc. (Special publ.) 4, 369-387 (1948).

73. Twitty,V.C.: Correlated genetic and embryological experiments on Triturus. I. Hybridisation. Development of three species of Triturus and their hybrid combinations. II. Transplantation. The embryological basis of species differences in pigment pattern. J. Exper. Zool. 74, 239-302 (1936).

74. van Campenhout,E.: Le rôle de la crête ganglionnaire dans la formation du mésenchyme céphalique chez l'embryon du poulet. Comptes rendus de la Societé de Biologie 124, 1005-1006 (1937).

75. Virchow,R.: Ein Fall von allgemeiner Ochronose der Knorpel und knorpelähnlichen Theile. Arch. path. Anat. 37, 212 (1866).

76. Weidenreich,F.: Die Lokalisation des Pigmentes und ihre Bedeutung in Ontogenie und Phylogenie der Wirbeltiere. Zschr. für Morph. und Anthrop., Sonderheft 2, 59-140 (1912).

Lebenslauf

Am 27. August 1943 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Adolf Fischer und seiner Ehefrau Martha-Luise, geb. Schnauf, in Giessen geboren. Bis zum Jahre 1946 wohnte ich in Lollar bei Giessen, danach drei Jahre in Mörshausen, einem kleinen Dorf bei Homberg an der Efze, und seit Oktober 1949 in Kassel.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule Kirchditmold und anschließend neun Jahre die Albert-Schweitzer Schule in Kassel. 1963 bestand ich an dieser Schule die Reifeprüfung.

Im Mai 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Philipps-Universität in Marburg, wo ich 1964 die naturwissenschaftliche und 1965/66 nach 5 semestrigem Studium die ärztliche Vorprüfung ablegte. Anschließend ging ich für zwei klinische Semester (SS 1966 und WS 1966/67) zur Christian-Albrechts-Universität in Kiel.

Zurück in Marburg, begann ich im August 1967 mit der Arbeit an der vorliegenden Dissertation. Im Januar 1969 bestand ich nach 11-semestrigem Studium das Medizinische Staatsexamen an der Universität Marburg.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent am Physiologisch-Chemischen Institut II (Lahnberge) der Universität Marburg beschäftigt.

Marburg, im Juli 1969

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg: Becker, Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Clausen, Dimroth, Dölle, Drawert, Düker, du Mesnil, Ehrhardt, Exner, Gedigk, Golenhofen, Graul, Grebe, Hamm, Hardewig, Hensel, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Hundeshagen, Jakob, Karlson, Klingenberg, Knauff, Kühnel, Kunz, Lang, Lehmann-Grube, Lindner, Linneweh, Löhr, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, Nocke, Oehmig, Petry, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Schermuly, Schiff, Schimassek, Schleyer, Schmid, Schneider, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher, Vogt, Voss, Walcher, Wendt, Witzel, Würtele, Zilliken

und in Kiel: Bernsmeier, Brunck, Gärtner, Gottstein, Hallermann, Herrlinger, Huber, Knothe, Lennert, Löhr, Lüllmann, May, Merkel, Staemmler, Vetter und Wulf.